

Magomed Futijev

Eräiden lääkeainelaboratorion synteesituotteiden rakenteiden varmistuksesta NMR -spektrometrialla.

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri AMK

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

11.11.2015

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Magomed Futijev Eräiden lääkeainelaboratorion synteesituotteiden rakenteiden varmistuksesta NMR -spektrometrialla. 30 sivua + 2 liitettä 11.11.2015
Tutkinto	Insinööri AMK
Koulutusohjelma	Kemiantekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Prosessien suunnittelu ja -käyttö
Ohjaaja(t)	professori Hannu Elo yliopettaja Kari Salmi
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutustua NMR -spektroskopian analyysimenetelmään ja sen teoriaan. NMR -laitteistoon tutustuminen, näytteiden valmistus ja niiden mittaus NMR -spektrometrillä sekä mitatun tiedon käsittely kuului työn keskeisempiin tehtäviin. Tutkittavat näytteet valmistettiin useista sekä uusista että vanhoista synteeseistä, jotka olivat syntesoituja Helsingin yliopiston Biokeskuksessa farmaseuttisen biologian osastolla. Nämä olivat synteesituotteet, joita on tutkittu aikaisemmin ja nyt tarkoituksena oli varmistaa niiden rakenne NMR -spektrometrisesti. Tarkoituksena oli myös tarkastella ydinmagneettista resonanssia ilmiönä sekä tutustua syvällisemmin kemialliseen siirtymään vaikuttaviin tekijöihin ja spin-spin-kytkeytymiseen sekä siihen perustuviin ^1H- ja ^{13}C NMR -kokeisiin. Ja hyödyntää tämä NMR -spektroskopian avulla saatua tietoa rakennetutkimuksessa.</p> <p>Työssä suoritettiin myös yksi orgaaninen synteesi, salisyylidoksiimin sulfonoitua vesiliukoista johdosta, 5-sulfosalisyylidoksiimin natriumsuolaa, jota tarvitaan lääkeainetutkimuksiin. Saadusta tuotteesta valmistettiin myös NMR -näyte ja varmistettiin sen rakenne NMR -spektrometrisesti.</p> <p>Kaikki mittaukset suoritettiin Varian Mercury Plus 300 MHz NMR -spektrometrillä. Näytteistä mitattiin ^1H ja ^{13}C NMR -spektrit, joista pääteltiin niiden yhteensopivuutta tutkittavien synteesien oletettujen rakenteiden kanssa.</p>	
Avainsanat	NMR, spektrometri, synteesi, spektrien tulkinta

Author(s) Title Number of Pages Date	Magomed Futijev Using NMR spectroscopy to confirm the structures of the synthesis products of a pharmaceutical laboratory. 30 pages + 2 appendices 11 November 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Chemical Engineering
Specialisation option	Design and Operation of Processes
Instructor(s)	Hannu Elo, professor Kari Salmi, principal lecturer
<p>The purpose of this study was to explore analytical method of NMR spectroscopy and its theory. Introduction to NMR equipment, sample preparation, measurements by NMR spectrometer as well as processing of the measured data were the main topics of this thesis. The examined samples were prepared from several new as well as old synthesis that were synthesized at the Department of Pharmaceutical Biology at the Biocenter of the University of Helsinki. These were products of syntheses that had been investigated earlier, and now the aim was to verify their structure using NMR spectroscopy. The purpose of this study was also to examine nuclear magnetic resonance as a phenomenon as well as explore more deeply the factors affecting chemical shift, the spin-spin coupling and the ^1H and ^{13}C NMR experiments based on it. Finally, the aim was to use information gained by NMR spectroscopy for structure determination</p> <p>Also one organic synthesis was carried out during this thesis: the soluble sulfonated salicylaldehyde, 5-sulfosalicylaldehyde sodium salt, which is required for drug studies. An NMR sample of the obtained product was prepared and its structure was confirmed by NMR spectrometry.</p> <p>All the measurements were performed with the Varian Mercury Plus 300 MHz NMR spectrometer. The samples were measured for ^1H and ^{13}C NMR spectra on the basis of which their compatibility with the proposed structures of the studied synthesis.</p>	
Keywords	NMR, spectrometer, synthesis, spectra assignments

Sisällys

1	Johdanto	1
2	NMR -spektroskopia	1
2.1	Teoria	2
2.1.1	Kemiallinen siirtymä	4
2.1.2	Spin-spin-kytkentyminen	8
2.2	NMR -spektrometri	10
2.3	NMR -näytteen valmistus	11
2.4	NMR -spektrin mittaus	12
3	Työn suoritus	13
3.1	Käytetyt reagenssit	13
3.2	Synteesin suoritus	13
3.3	NMR -mittaukset	15
4	Tulokset	16
4.1	5-sulfosalisyylialdoksiimin NMR -spektrien tulkinta	16
4.2	5-sulfosalisyylialdehydin NMR -spektrien tulkinta	19
4.3	Salisyylideenianilidin NMR -spektrien tulkinta	21
4.4	Kamferikinoni-(guanyylihydratsonin) NMR -spektrien tulkinta	23
4.5	Pyridiini-2-karboksialdehydin tiosemikarbatsonin NMR -spektrien tulkinta	25
4.6	Dimetyylipyratsiinijohdoksen NMR -spektrien tulkinta	28
5	Yhteenveto ja johtopäätökset	30
	Lähteet	31
	Liitteet	
	Liite 1. Kamferikinoni-(guanyylihydratsonin) röntgendiffraktiometrisesti mitattu avaruus-rakenne	
	Liite 2. Kamferikinonin ^1H NMR -spektri	

1 Johdanto

NMR -spektroskopiasta on tullut yksi tämän päivän tärkeimmistä analyysimenetelmistä orgaanisen kemian rakennetutkimuksissa. Se on löytänyt erilaisia sovellutuksia monilla tieteenalioilla, kuten lääketieteessä, biotieteessä ja muissa erilaisissa tieteellisissä tutkimuksissa. Menetelmän etuina pidetään sen korkea herkkyys ja erottelukyky sekä suhteellisen helppo ja yksinkertainen näytteen valmistus. [1]

NMR -spektroskopia antaa tietoa molekyylien rakenteesta, liikkeestä ja niiden keskinäisistä vuorovaikutuksista sekä muista molekyylin ominaisuuksista. Sen avulla pystytään määrittämään yksityiskohtaisesti tutkittavan yhdisteen rakennetta. NMR -kokeiden avulla saatu tieto perustuu spektrometriin parametreihin, kuten ydinvarjostus ja spin-spin kytkentä. NMR -mittaukset tehdään tavallisesti deuteroiduissa liuoksissa. Tulokseksi saadaan spektri, josta nähdään atomien kemialliset siirtymät, signaalien intensiteetit sekä niiden jakautumat. Tavalliset NMR -kokeet ovat ^1H ja ^{13}C NMR -mittaukset ja monimutkaisempien molekyylien rakenteiden määrittämisessä suoritetaan 2D- ja 3D-NMR -mittauksia. Tässä työssä tutustutaan NMR -spektroskopian perusteisiin ja tehdään siihen liittyvät yksinkertaiset ^1H -ja ^{13}C NMR -mittaukset. [2]

Tämä työ tehtiin Helsingin yliopiston Biokeskuksessa farmaseuttisen biologian osastolla, jonka ensisijaisena tarkoituksena oli tutustua NMR -spektroskooppiseen analyysimenetelmään ja varmistaa erilaisten lääkeainetutkimuksissa käytettävien aineiden oletetut rakenteet NMR -spektroskooppisesti. Sekä suorittaa synteesi tunnettuja menetelmiä soveltaen saadaksesen aikaan toimiva tarkka synteesiohje, jota työn suorituspaikassa voidaan jatkossa käyttää.

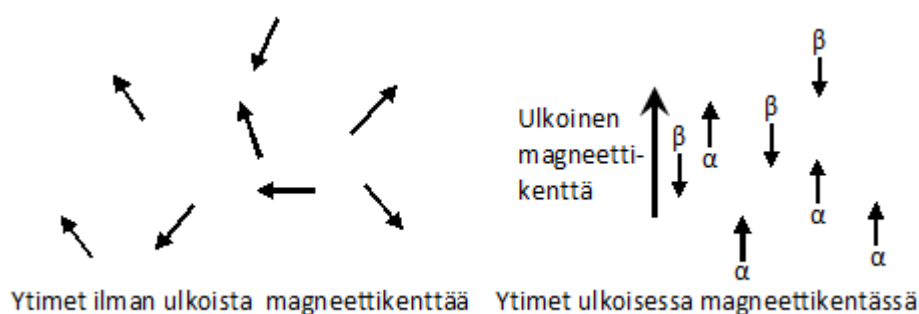
2 NMR -spektroskopia

NMR (nuclear magnetic resonance) -spektrometria eli ydinmagneettinen resonanssispektrometria on yksi magneettiresonanssispektrometrisistä menetelmistä. Se perustuu atomiytimien käyttäytymiseen ulkoisessa magneettikentässä. NMR -spektrometria tuli orgaaniseen kemiaan 1900-luvun puolivälissä ja se on tänä päivänä orgaanisen kemian tärkein ja eniten käytetty spektroskopia- ja rakennetutkimusmenetelmä. Tämä ei

kuitenkaan tarkoita, että se korvaa vanhempia spektroskooppisia menetelmiä, vaan täydentää niitä. Sillä voidaan tutkia tuntemattomien orgaanisten yhdisteiden rakenteita, molekyylien ja atomien välisiä vuorovaikutuksia sekä päätellä niiden ominaisuuksia ja paljon muuta. Orgaanisen kemian lisäksi sen sovelluksia ja käyttökohteita ovat fysiikka, biologia ja lääketiede. NMR -spektroskopia poikkeaa muista tavallisista spektroskooppisista menetelmistä, jossa käytetään hyväksi vain säteilyä, kuten esimerkiksi ultraviolettii- (UV)- ja infrapuna-(IR)-spektroskopia siten, että NMR -spektroskopiassa käytetään säteilyn lisäksi myös vahvaa magneettikenttää. Niin kuin muissakin spektrilajeissa NMR -spektroskopiassa tapahtuu energian kvantittuminen, joka riippuu magneettikentän voimakkuudesta. Verrattuna muihin spektrometriisiin mittauksiin, siihen tarvitaan enemmän näytettä, sen lisäksi se on kallis menetelmä, koska se vaatii kalliita laitteita ja nestetyypen sekä nesteheliumin täyttöä säännöllisen väliajoin. [3]

2.1 Teoria

Tarkasteltavaa atomiytimen liikettä NMR -spektroskopiassa kutsutaan ydinspiniksi. Atomien ytimet ovat positiivisesti varautuneita ja monien isotooppien ytimet käyttäytyvät ikään kuin ne pyörisivät kuvitellun pyörimisakselinsa ympäri. Tällaiset pyörivät ytimet käyttäytyvät kuin pienet magneettisauvat. Pyörimisliikkeessä oleva varaus luo magneettisen momentin, joka vuorovaikuttaa ulkoisen magneettikentän kanssa. Magneettikentän puutteessa tällaiset ytimet asettuvat satunnaisesti eri suuntiin, mutta niillä on tärkeitä kvantittumisominaisuuksia, jonka ansiosta magneettikentässä ne asettuvat vain tiettyihin suuntiin. Kuva 1 havainnollistaa tämän ilmiön. [4, s. 326]



Kuva 1. Ytimet jotka ovat asettuneet magneettikentän puutteessa ja ulkoisessa magneettikentässä. [4 s. 326 mukaillen]

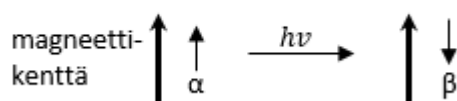
Jotkut tärkeät ytimet niiden mittausherkkyyden ansiosta, kuten ^1H , ^{13}C and ^{19}F voivat saada vain kahta erilaista kvanttilukuihin kytkeytyvää arvoa $+1/2$ ($=\alpha$) ja $-1/2$ ($=\beta$). Toisin

sanoen nämä ytimet voivat asettua magneettikentässä, joko magneettikentän suuntaisesti, joka vastaa α -spiniä tai sen vastakkaissuuntaan, joka vastaa β -spiniä. Näillä kahdella eri tasolla on hieman erilaiset energiat, joiden energiaero ΔE on suoraan verrannollinen ulkoisen magneettikentän voimakkuuteen. Ytimellä, joka on asettunut magneettikentän vastakkaissuuntaan, on korkeampi energiataso kuin sillä, joka on asettunut magneettikentän suuntaisesti. [4, s. 326]

Jos systeemiä säteilytetään radioaalloilla sopivalla taajuudella, α -spiniä vastaava ydin voi absorboida valokvantin ja muuttua korkeampaa energiatasoa vastaavan β -spiniksi. Tilannetta havainnollistaa kuva 2. Absorptioon tarvittavan säteilyn taajuus saadaan kaavalla 1.

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} \quad (1)$$

Kaavassa 1 h on Planckin vakio. Tämän valokvantin absorboituminen NMR -spektrometrissä havaitaan resonanssitaajuisena signaalina. [4, s. 326]

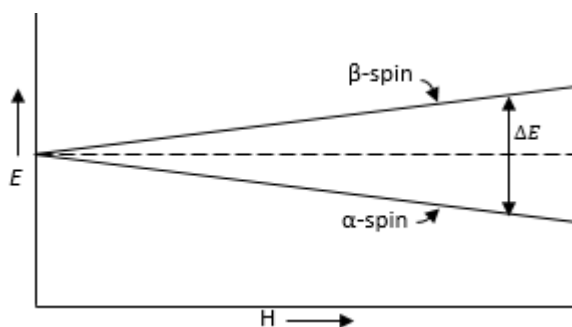


Kuva 2. α -spiniä vastaava ydin muuttuu radioaalto säteilytyksestä korkeampaa energiatasoa vastaavan β -spiniksi. [4, s. 326 mukaillen]

Näiden kahden tason energiaeroa vastaava taajuus saadaan kaavalla 2.

$$\nu = \frac{\gamma H}{2\pi} \quad (2)$$

Kaavassa 2 H on magneettikentän voimakkuus ytimessä ja γ on gyromagneettinen suhde, joka on kullekin magneettiselle ytimelle ominainen vakio. Eli energiaero α - ja β -spinin välillä magneettikentässä on suoraan verrannollinen magneettikentän voimakkuuteen. Toisin sanoen mitä suurempi on magneettikentän voimakkuus, sen suurempi on energiaero α - ja β -spinin välillä. Tämä tilanne on havainnollistettu kuvassa 3. Jos kenttää ei ole, spineillä ei ole energiaeroa. [4, s. 327]



Kuva 3. Energiaero α - ja β -spinin välillä magneettikentässä on suoraan verrannollinen magneettikentän voimakkuuteen. [4, s. 327 mukaillen]

Monilla ytimillä ei ole spiniä. Tällaiset ovat ytimet, joilla on parillinen määrä protoneja ja neutroneja. Tähän kuuluvat sellaiset ytimet, kuten ^{12}C ja ^{16}O , jotka ovat magneettisesti ei-aktiivisia. [5, s. 2]

2.1.1 Kemiallinen siirtymä

Ytimen NMR -taajuus molekyylissä määräytyy pääasiassa sen kokemaan magneettikentän voimakkuuteen H ja sen gyromagneettisesta suhteesta γ kaavaan 2 mukaan. Alla on laskettu ^1H ja ^{13}C -ydinten NMR -taajuudet ja niitä vastaavat energiaerot.

$$(^1\text{H})\nu = \frac{\gamma H}{2\pi} = \frac{26,75 \cdot 10^7 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 9,4 \text{ T}}{2\pi} = 400045498,8 \text{ Hz} \approx 400 \text{ MHz}$$

$$(^1\text{H})_{\Delta E} = \nu h = 400045498,8 \text{ Hz} \cdot 6,6260755 \cdot 10^{-34} \frac{\text{m}^2 \text{ kg}}{\text{s}} = 2,650729494 \cdot 10^{-25} \text{ J} \approx 2,65 \cdot 10^{-25} \text{ J}$$

$$(^{13}\text{C})\nu = \frac{\gamma H}{2\pi} = \frac{6,73 \cdot 10^7 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 9,4 \text{ T}}{2\pi} = 100684600,1 \text{ Hz} \approx 100,7 \text{ MHz}$$

$$(^{13}\text{C})_{\Delta E} = \nu h = 100684600,1 \text{ Hz} \cdot 6,6260755 \cdot 10^{-34} \frac{\text{m}^2 \text{ kg}}{\text{s}} = 6,671432122 \cdot 10^{-26} \text{ J} \approx 6,67 \cdot 10^{-26} \text{ J}$$

Näin ollen protoni, jonka gyromagneettinen suhde on $26,75 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 9,4 T:n magneettikentässä resonoi taajudella 400 MHz, joka vastaa energiaeroa $2,65 \cdot 10^{-25} \text{ J}$. Ja ^{13}C -ydin vastaavasti resonoi taajudella 100,6 MHz samansuuruisessa magneettikentässä, joka vastaa energiaeroa $6,67 \cdot 10^{-26} \text{ J}$. Taulukossa 1 on esitetty yleisimpien NMR -ytimien gyromagneettiset suhteet. [5, s. 8]

Taulukko 1. Gyromagneettiset suhteet, NMR -taajuudet (9,4 T:n kentässä) ja kunkin ytimen esiintyminen luonnossa. [5, s. 3]

	$\gamma/10^7 T^{-1} s^{-1}$	ν/MHz	Esiintyminen luonnossa/%
1H	26,75	400,0	99,985
2H	4,11	61,4	0,015
^{13}C	6,73	100,6	1,108
^{14}N	1,93	28,9	99,63
^{15}N	-2,71	40,5	0,37
^{17}O	-3,64	54,3	0,037
^{19}F	25,18	376,5	100,0
^{29}Si	-5,32	79,6	4,70
^{31}P	10,84	162,1	100,0

Kuitenkaan kaikilla protoneilla tai ^{13}C -ytimillä ei ole yhtäläinen resonanssitaajuus, vaan jokaisen ytimen resonanssitaajuus on riippuvainen sen sijainnista molekyylissä. Tämä vaikutus nimeltään ”kemiallinen siirtymä” tekee NMR -spektroskopiasta niin mielenkiintoisen kemistille. Se mahdollistaa erottaa keskenään esimerkiksi etanoliin sitoutuneet kolme eri asemassa olevat vetyatomit. [5, s. 8]

Kemiallinen siirtymä johtuu siitä, että atomissa tai molekyylissä olevan ytimen kokema magneettikenttä H eroaa hiukan ulkoisesta magneettikentästä H_0 , eli se kenttä jota yksittäinen ydin kokisi. Ytimessä magneettikenttä H on hiukan pienempi kuin ulkoinen magneettikenttä H_0 , koska ulkoinen magneettikenttä aiheuttaa elektronien pyörimistä elektroniverhossa niin, että niiden liike indusoi oman pienen magneettikentän H' . [5, s. 8]

Tästä syystä ytimen kokema magneettikenttä H saadaan kaavasta 3:

$$H = H_0 - H' \quad (3)$$

Kaavassa 3 H_0 on ulkoinen magneettikenttä ja H' on ytimen indusoima magneettikenttä. Koska ydin kokee pienemmän magneettikentän kuin ulkoinen magneettikenttä

sen sanotaan olevan varjostettu ulkoisesta magneettikentästä sitä ympäröivillä elektroneilla. Tätä kyseistä tyyppiä varjostusta kutsutaan diamagneettiseksi varjostukseksi. [5, s. 8]

Elektronien liikkeen indusoima magneettikenttä H' on verrannollinen ulkoiseen magneettikenttään H_0 eli mitä vahvempi ulkoinen magneettikenttä sitä enemmän se liikuttaa elektroneja, ja on tyyppillisesti ulkoista magneettikenttää 10^4 - 10^5 kertaa pienempi. [5, s. 9]

Näin ollen magneettikenttä ytimessä voidaan kirjoittaa seuraavasti:

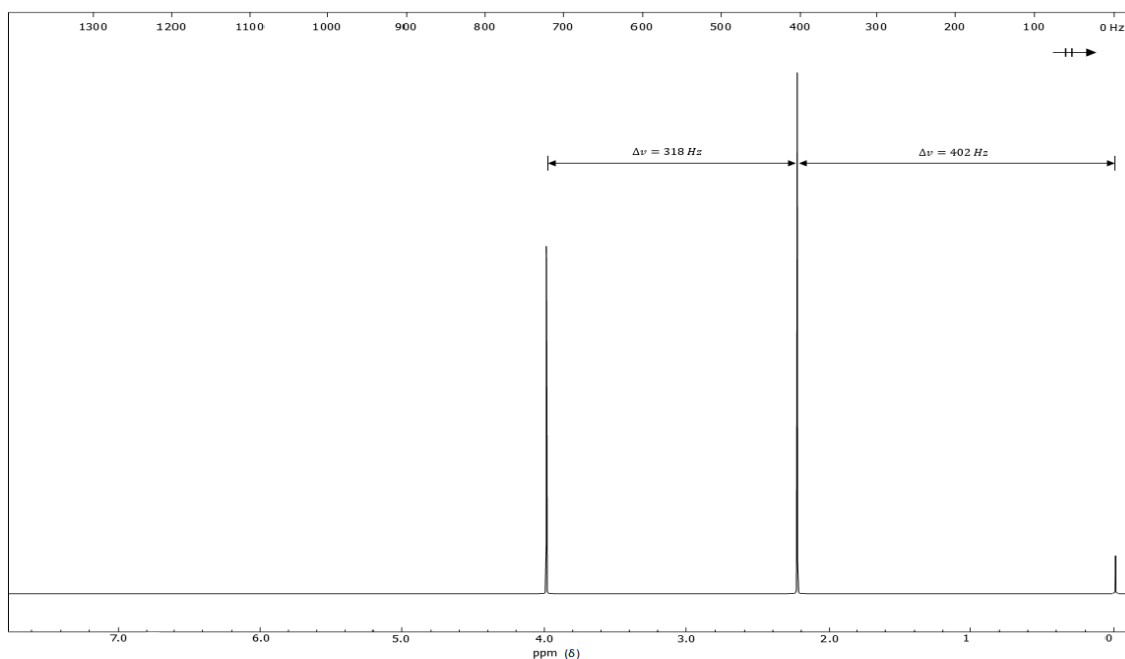
$$H = H_0 - H' = H_0(1 - \sigma) \quad (4)$$

Kaavassa 4 σ on varjostusvakio, joka kertoo kenttien H' ja H_0 välistä suhteellisuutta. Ydinvarjostuksesta seuraa, että resonanssi ehto (kaava 1) muuttuu:

$$\nu = \frac{\gamma H_0(1 - \sigma)}{2\pi} \quad (5)$$

Toisin sanoen ytimen resonanssitaajuus atomissa on hieman pienempi kuin yksittäisen ytimen. Näin ollen varjostuksen määrä ja sen suuruus määräytyy molekyylissä tai atomissa olevaa ydintä ympäröivistä elektroneista. [5, s. 9]

Esimerkkinä 1,2,2- trikloropropaani, $\text{CH}_3\text{CCl}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, antaa spektrin, joka on esitetty kuvassa 4. Tässä protonispektrissä näkyy kaksi terävää piikkiä, jotka vastaavat metyleeni- ja metyyli-ryhmää. Metyleeni-ryhmä CH_2 on sitoutuneena elektronegatiiviseen kloori-atomiin, joka vetää puoleensa hiilen ja vedyn elektroneja. Koska metyleenin protoneilla on pienempi elektronitiheys, niiden diamagneettinen varjostus on pienempi kuin metyylin protoneilla. Tästä syystä metyleenin CH_2 indusoima magneettikenttä on pienempi verrattuna metyylin CH_3 indusoimaan magneettikenttään, joten resonanssin saavuttamiseksi ulkoista magneettikenttää pitää suurentaa vähemmän. Siitä johtuen metyleenin protonit näkyvät metyylin protoneihin verrattuna vasemmalla. Näin ollen metyleenin protonit näkyvät korkeammalla taajuudella kuin metyylin protonit taajuuserolla 318 Hz. [4, s. 329]



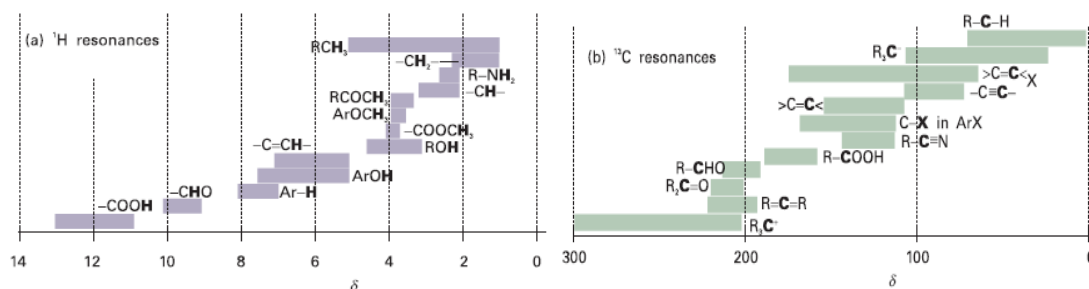
Kuva 4. 1,2,2-trikloropropanin ^1H NMR -spektri [4. s 329 mukaillen]

Ytimet erilaisissa funktionallisissa ryhmissä antavat tiettyjä NMR -signaaleja spektrin mitta-asteikossa niiden erilaisista varjostusvakioista σ riippuen. Tietty yhdiste on valittu referenssiyhdisteeksi, jonka piikki on valittu NMR -spektrin mitta-asteikolla nollakohtaksi. Usein referenssiyhdisteenä käytetty ^1H - ja ^{13}C -NMR -mittauksissa on tetrametyylisilaani $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, josta käytetään lyhennettä TMS. Se on haihtuva neste, joka on inertti useimmille reagensseille ja liukeneva monissa orgaanisissa liuoksissa. Pieni määrä tätä yhdistettä on lisätty tutkittavaan 1,2,2-trikloropropani-näytteeseen ja sitä vastaava piikki näkyy kuvassa 4 esitetyn spektrin oikeassa laidassa. Yhdisteen funktionalisten ryhmien piikkien paikat eli kemiallinen siirtymä δ määritellään seuraavan kaavan mukaan:

$$\delta_i = \frac{v_i - v_{ref}}{v_0} \times 10^6 \text{ ppm} \quad (6)$$

Kaavassa 6 v_i on ytimen resonanssitaajuus, v_{ref} on referenssiyhdisteen resonanssitaajuus ja v_0 on NMR -spektrometrin toimintataajuus. [4. s. 330]

Kemialliset siirtymät mitataan huippujen etäisyytenä referenssiyhdisteen huipusta. Yhdisteen molekyyliarakenteen tulkinnassa voidaan hyödyntää kemiallisia siirtymäarvoja vertaamalla niitä vastaaviin taulukkoarvoihin, jotka on esitetty kuvassa 5. [6, s. 789]



Kuva 5. Tyypillisiä kemiallisia siirtymiä ^1H ja ^{13}C NMR -spektreille suhteessa tetrametyylisilaaniin (TMS). [7]

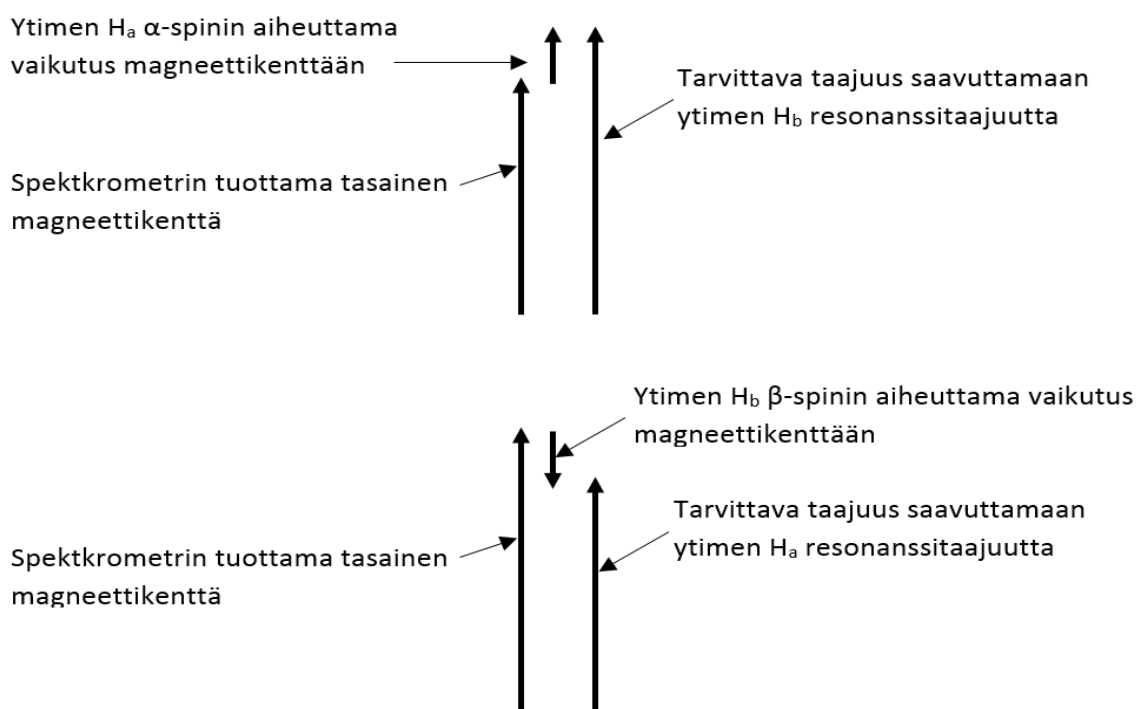
Kemiallisen siirtymän arvot ovat magneettikentästä riippumattomia ja ne ilmoitetaan yksikössä ppm (parts per million). Sen arvo kasvaa mentäessä oikealta vasemmalle. Näin ollen ytimen signaali ilmestyy sitä enemmän spektrin vasemmalle laidalle mitä vähemmän ytimessä on varjostusta. [6 s. 787–788]

2.1.2 Spin-spin-kytkeytyminen

Kemiallisen siirtymän lisäksi on olemassa myös toinen hyvin tärkeä tietolähde, jota käytetään NMR -spektrien tulkinnessa liittyen ydinten magneettisten vuorovaikutukseen. Tästä ydinten magneettisesta vuorovaikutuksesta käytetään nimitystä spin-spin kytkeytyminen. Naapuriydinten välillä tapahtuvista vuorovaikutuksista aiheutuu ydinten resonanssien jakautuminen useaksi spektriviivaksi. Näistä ydinten välisistä vuorovaikutuksista aiheutuvaa kahden spektriviivan välistä taajuuseroa kutsutaan kytkentäväkioksi J . Kytkentäväkio mittaa kuinka vahvasti ytimet vuorovaikuttavat keskenään. Se on magneettikentästä riippumaton vakio ja sen arvo ilmoitetaan hertseinä. Sen arvon suuruus riippuu molekyylin elektronirakenteesta ja siitä kuinka monen sidoksen päässä ytimet ovat toisistaan. [5, s. 22]

Ydinten välinen vuorovaikutus aiheutuu ytimen luomasta pienestä magneettikentästä, joka muuttaa naapuriytimen kokema magneettikenttää. Jos tarkastellaan ydintä H_a , joka on vuorovaikutuksessa sen naapuriytimeen H_b . Ytimen H_a magneettinen momentti luo pienen magneettisen kentän, joka vuorovaikuttaa viereiseen ytimeen H_b elektroniverhon kautta muuttaen sen magneettikenttää. Ytimen H_a spinistä riippuen ytimen H_b magneettikenttä joko voimistuu tai heikkenee. Jos ytimellä H_a on α -spin seuraa siitä, että ytimen H_b kokema magneettinen kenttä on hieman suurempi kuin pelkästään NMR -

spektrometrin tuottama magneettinen kenttä. Sen seurauksena tarvitaan hieman suurempi taajuus saavuttamaan ytimen H_b resonanssitaajuutta kuin tarvittaisiin ytimen H_a puutteessa. Tämä tapaus on esitetty kuvan 6 yläosassa. Kun taas ytimellä H_a on β -spin seuraa päinvastainen ilmiö. Eli ytimen H_b kokema magneettinen kenttä on hieman pienempi kuin pelkästään NMR -spektrometrin tuottama magneettinen kenttä. Joten tarvitaan hieman pienempi taajuus saavuttamaan ytimen H_a resonanssitaajuutta. Tämä tapaus on esitetty kuvan 6 alaosassa. Tällaisessa tapauksessa ytimet H_a ja H_b sanotaan olevan kytkeytyneet keskenään. [4, s. 341–342]



Kuva 6. Kaaviokuva spin-spin kytkeytymisestä [4, s. 341 mukaillen]

Ydinten kytkeytymisestä seuraa, että NMR -signaali jakautuu kahdeksi spektriviivaksi eli dupletiksi. Signaali voi jakautua myös useammaksi spektriviivaksi riippuen siitä, kuinka monta naapuriydintä vaikuttavat viereiseen ytimen kokemaan magneettikenttään. Signaali voi jakautua $n+1$ määrä piikkeihin, jossa n on magneettisten naapuriydinten lukumäärä. Tämä voidaan esittää Pascalin kolmion muodossa taulukossa 2 esitetyllä tavalla

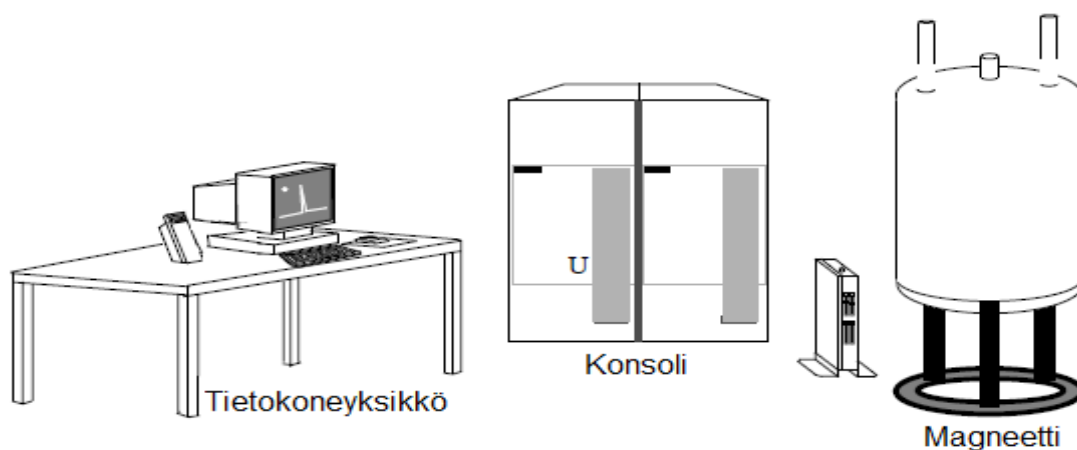
Taulukko 2. Intensiiteettijakautuma Pascalin kolmiossa esitettynä [6, s. 798 mukailten]

Naapuriydinten lukumäärä (n)	Multiplisiteetti	Intensiiteettisuhde				
0	singletti	1				
1	dubletti	1 1				
2	tripletti	1 2 1				
3	kvartetti	1 3 3 1				
4	kvintetti	1 4 6 4 1				

Mikäli kytkeytyneet ytimet ovat kemiallisesti ekvivalenttisia eli niillä on samanlainen kemiallinen ympäristö, niiden keskinäinen kytkeytyminen ei tule lainkaan näkyviin spektrissä ja nähdään vain yksi piikki eli singletti. [4, s. 342–344]

2.2 NMR -spektrometri

NMR -spektrometrin perusosat on esitetty kuvassa 7, joka sisältää kolme tärkeää rakennosaa: magneetti, konsoli ja tietokoneyksikkö. NMR -spektrometrin toimintaperiaatetta voidaan verrata radiojärjestelmään. Joissakin sen osien nimityksessä käytetäänkin radiojärjestelmässä käytettyjä termejä, kuten lähetin, syntetisaattori ja vastaanotin. [8, s. 65]



Kuva 7. NMR -spektrometrin perusosat [9]

NMR -spektrometrin magneetti tuottaa vakaan staattisen magneettikentän, jota käytetään luomaan magnetoituman NMR -näytteessä. Radiotaajuuslähetin indusoi(luo) värähtelevän sähkömagneettisen kentän halutulla voimakkuudella vuorovaikuttamaan tutkittavan

ytimen kanssa. Radiotaajuuspulssin säteilytyksestä syntyy näytteestä tuleva radioaalto-signaali niin kutsuttu FID -signaali detektorin käämissä, jota vahvistetaan vahvistimen avulla ja havaitaan vastaanottimessa. Tämä havaittu signaali muutetaan digitaalseksi A/D-muuntimella. Sitä voidaan sitten käsitellä tietokoneyksikössä. [8, s. 65]

Suprajohtava magneetti on NMR -spektrometrin keskeisin osa, jonka kohtioiden välissä olevaan näytetilaan vaaditaan erittäin homogeeninen magneettikenttä. [10, s. 130]

2.3 NMR -näytteen valmistus

NMR -näytteen oikeaoppinen valmistus on yksi tärkeimmistä vaiheista näytteen tutkimuksessa NMR -spektrometriassa, koska oikein valmistetusta NMR -näytteestä monessa tilanteessa riippuu koko tutkimuksen lopputulos. [11, s. 64]

Tavallisesti NMR -spektrometriassa nestemäisten näytteiden tutkimuksissa käytetään näytteen liuottimena deuteroituja liuottimia, jonka protonit on korvattu deuteriumilla eli raskaalla vedyllä. Deuteroidun liuottimen tarkoituksena on vähentää protonispektriä häiritseviä ^1H -signaaleja. Lisäksi sitä käytetään lukkosignaalina stabilisoimaan magneettikenttää mittauksen aikana. [11 s. 64]

Yleisimmin käytettyjä liuottimia NMR -spektrometriassa ovat deuteroitu asetoni, deuteroitu kloroformi, deuteroitu dimetyylisulfoksidi ja raskas vesi. Liuottimen valinta ennen kaikkea perustuu sen hyvään liuotusominaisuuteen, mutta deuteroitujen liuottimien korkean hinnan vuoksi näytteen liukoisuutta tarkistetaan yleensä ensin muilla liuottimilla esim. tavallisella vedellä. [11, s. 64]

NMR -näytteet mitataan lasisissa NMR -putkissa, joista yleisin laboratorioissa käytetty on halkaisijaltaan 5 mm. Tämän kokoiseen NMR -putkeen sopiva määrä liuotinta on 500 - 700 μl . Tavalliseen ^1H NMR -mittaukseen punnitaan noin 1 - 10 mg näytettä ja ^{13}C NMR -mittaukseen pitää punnita noin 50 - 100 mg. Mitä pienempi on näytteen määrä sitä pidempi on tavallisesti sen mittausaika. [11, s. 64]

NMR -näytteen valmistamiseen on aina käytettävä puhtaita ja kuivia välineitä sekä NMR -putkia, joihin näytteet siirretään. Tutkittava näyte ensin punnitaan pieneen lasipulloon ja liuotetaan deuteroituun liuottimeen, kunnes kaikki aine on liuennut. Valmiin näytteen

pitää olla homogeeninen, eikä se saa sisältää sakkaa, kiinteitä hiukkasia tai muita epäpuhtauksia. Jos aine ei ole liuennut kunnolla tai näytteessä on sakkaa tai muita epäpuhtauksia se suodatetaan pumpulilla Pasteur-pipetin läpi NMR -putkeen, paremman NMR -spektrin varmistamiseksi. Valmistettu näyte siirretään automaattipipetillä (Finnpipetti) NMR -putkeen ja suljetaan tiiviillä muovisella korkilla, jonka jälkeen varustetaan lapulla, jossa ilmenee näytteen nimi ja sen määrä, liuotin sekä päivämäärä, jolloin näyte on valmistettu. [12]

NMR -putket tulee pestä aina käytön jälkeen ja niiden pesuun käytetään yleensä sopiva orgaaninen liuotin, kuten asetoni tai tislattu vesi. Pesun jälkeen putket jätetään kuivumaan huoneenlämmössä. [12]

2.4 NMR -spektrin mittaus

Ennen kuin NMR -putki syötetään NMR -laitteeseen, se laitetaan spinneriin. Spinneri on polymeeristä tehty tarttuma-väline, jonka tarkoituksena on pitää NMR -putki tukevasti paikallaan ja pyörittää sitä kohtioiden välissä olevassa näytetilassa. NMR -putki pitää sijoittaa spinneriin siten, että näyteliuos osuu detektorin kohdalle, mutta se ei myöskään saa olla liian syvällä spinnerissä, jottei se osuisi laitteessa olevaan mittapäähän. Tämä varmistetaan käyttämällä syvyysmittaa, jonka avulla voidaan kohdistaa näyteputki oikeaan syvyyteen. Syvyysmitta täytyy poistaa ja tarkistaa, että NMR -putki istuu tiukasti spinnerissä, ennen kuin laskee NMR -putken ja spinnerin näytetilaan. [13]

Näytteen nostaminen ja laskeminen tehdään paineilman avulla, jota ohjataan tietokoneella. Ennen kuin laittaa spinnerissä olevan NMR -putken laitteen aukon suulle varmistetaan, että paineilma virtaa. Tämän jälkeen asetetaan se putkeen ja suljetaan ilmavirta, jonka seurauksena näyteputki laskeutuu näytetilaan. [13]

Valitaan näytteen liuotin sekä näytemäärästä riippuen pulssitusten lukumäärä, relaksaatioaviive ja muut mittaukseen liittyvät parametrit. Näytteen kerättävästä datasta riippuen mitataan ^1H ja ^{13}C spektrit sekä monimutkaisemmat 2D ja 3D NMR -mittaukset. Tässä työssä tehtiin kuitenkin vain yksinkertaisempia ^1H ja ^{13}C -spektrien mittauksia. Nämä toiminnot suoritetaan tietokoneen avulla. [13]

3 Työn suoritus

Synteesin suorittamiseen käytetyt tarvikkeet olivat 50 ml:n erlenmeyerkolvi, jota käytettiin reaktioastiana, suodatin ja rakennettu tislauslaitteisto, joka koostui kolmikaulakolvista, johon liitettiin mikrotislauslaite ja tiputussuppilo sekä keräysastiaksi pieni kolvi.

Valmistettu tuote mitattiin Varian Mercury Plus 300 MHz NMR -spektrometrillä. Näytettä varten punnittiin 61,44 mg tuotetta ja liuotettiin se 800 µl:aan deuterioituun dimetyyli-sulfoksidiin (DMSO-d₆). Näytteestä mitattiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR -spektrit.

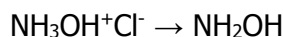
3.1 Käytetyt reagenssit

- A) 5-sulfosalisyylialdehydi (sulfo-1) valmistettu 7.3.2014 Helsingin yliopiston laboratoriossa.
- B) Hydroksyyliammoniumkloridi (HONH₃Cl)
- C) Natriumasetaatitrihydraatti (CH₃COONa·3H₂O)

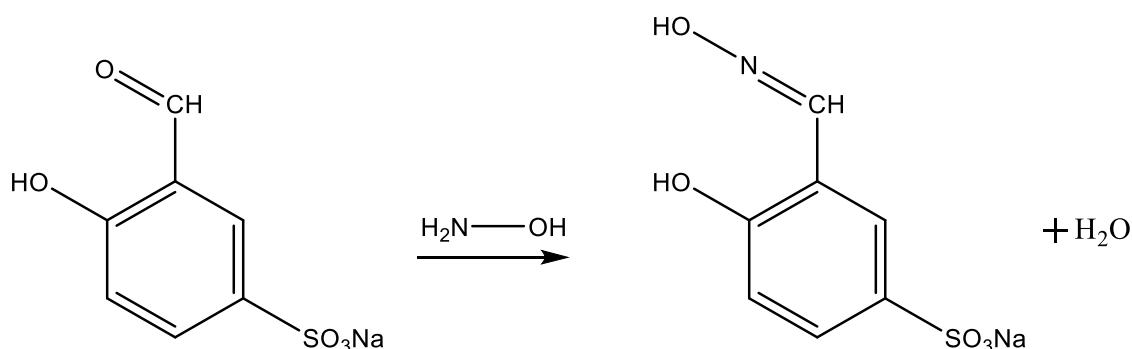
3.2 Synteesin suoritus

Synteesin tavoitteena oli valmistaa salisyylialdoksiimin sulfonoitua vesiliukoista johdosta, 5-sulfosalisyylialdoksiimin natriumsuolaa, jota tarvitaan lääkeainetutkimuksiin. Yhdiste on tunnettu ja sille on julkaistu synteesejä, mutta nämä eivät ole optimaalisia ja ongelmattomia, (Saarinen ja Evans) eikä menetelmien yksityiskohtia ole julkaistu niin tarkasti, että menetelmien suora soveltaminen olisi triviaalia.

Evansin ja Missenin [14] sekä Saarisen menetelmien perusidea on sama, hydroksyyliammoniumkloridi muutetaan emäksellä hydroksyyliamiiniksi,



minkä jälkeen hydroksyyliamiinin annetaan reagoida 5-sulfosalisyylialdehydin natriumsuolan kanssa (ks. kuva 8):



Kuva 8. 5-sulfosalisyylaldoksiimin natriumsuolan valmistus

Tavoitteena oli nyt tutkia mainittujen menetelmien soveltuvuutta käyttötarkoitukseen ja aikaansaada toimiva tarkka synteesiohje, jota työn suorituspaikassa voidaan jatkossa käyttää, sekä varmistaa tuotteen rakenne NMR -spektrometrisesti. Synteesin kaikki välivaiheet kirjoitettiin hyvin yksityiskohtaisesti laboratoriopäiväkirjaan, jonka perusteella kirjoitettiin seuraava synteesiohje.

Synteesin suorituksessa reaktioastiana käytettiin 50 ml erlenmeyerkolvia. Sekoitettiin siinä magneettisekoittimella punnittua 1,24163 g hydroksyyliammoniumkloridia ja 1 ml tislattua vettä 100 RPM:ssä. Lisättiin joukkoon 1 ml:ssa vettä 2,43518 g natriumasetaattia. Kun kaikki aine oli liuennut sekoituksessa, joukkoon lisättiin mittalasin tarkkuudella 42 ml absoluutista etanolia ja jatkettiin magneettisekoitusta. Havaittiin heti, että syntyi valkoinen sakka, jonka määrä lisääntyi sekoituksen aikana. Suljettiin erlenmeyerkolvi muovitulpalla ja laitettiin jäähauteeseen.

Jäähtynyt seos suodatettiin sintterille, josta suodatettu valkoinen sakka heitettiin pois ja suodos otettiin talteen. Punnittiin sulfosalisyylialdehydin raakatuotetta 4,0012 g ja siirrettiin se 250 ml:n kolviin, jonka jälkeen lisättiin siihen 42 ml tislattua vettä ja sekoitettiin magneettisekoituksella lämminvesihauteessa. Aloitettiin magneettisekoittimen lämmitys, jolloin melkein kaikki aine oli liuennut.

Lisättiin tähän seokseen aikaisemmin saatua suodosta ja jatkettiin magneettisekoitusta sekä sen lämmitystä. Tämän jälkeen otettiin kolvi pois hauteesta, jossa oli kirkas väritön liuos.

Rakennettiin tisluslaitteisto 200 ml:n kolmikaulakolvista, johon liitettiin mikrotisluslaite ja tiputussuppilo sekä keräysastiaksi pieni kolvi. Kolmikaulakolvi oli kuumassa vesihauhteessa, jota lämmitettiin magneettisekoittimella. Kun hauteen lämpötila saavutti 90 °C astetta, aloitettiin tislus lisäämällä suppilosta edellä valmistettua seosta. Tislauksen loppuvaiheessa seos alkoi saostua.

Tuotteena oli kuivaa valkoista massaa, jota suodatettiin imusuodoksessa. Suodatettua sakkaa uudelleenkiteytettiin vedestä, jonka jälkeen sitä suodatettiin ja tislattiin toistamalla tämä toimenpide kahdesti. Tislattu suodos jätettiin kiteytymään kylmähuoneeseen kolvissa. Kiteytynyt aine suodatettiin sintterille, jonka jälkeen suodatettu sakka jätettiin kuivumaan vetokaappiin. Sakka oli väriltään vaalea ja aivan lievästi punertavaa ja jauhemaista.

3.3 NMR -mittaukset

Mittaukset tehtiin Varian Mercury Plus 300 MHz NMR -spektrometrillä. Näyteputken ilmanpainepepyörytys oli 20 Hz, sisälämpötilan ollessa $24,0 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Näytteen rakenteesta riippuen pulssitusten lukumäärä oli 50 - 300 ja relaksaatioviive 1-6 s ^{13}C -mittauksissa. ^1H -mittauksissa pulssitusten lukumäärä oli 30 - 50, 1 s relaksaatio viiveellä.

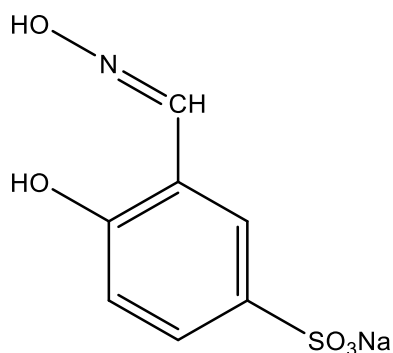
Synteesistä saadun tuotteen lisäksi valmistettiin myös useita muita näyteitä sekä vanhoista että uusista erilaisista synteeseistä, joita oli valmistettu Helsingin yliopiston farmaseuttisen biologian osaston laboratoriossa. Tutkittavat näytteet olivat lääkeainetutkimuksissa tarvittuja aineita. Punnittiin kukin näyte noin 40 mg pieneen näytepulloon ja liuotettiin sopivalla deuteroitulla liuottimella. Kaikki näytteet yhtä lukuun ottamatta liuotettiin 800 µl deuteroituun dimetyylisulfoksidiin (DMSO-d_6). Yksi näytteistä liuotettiin 800 µl deuteroituun veteen (D_2O). Huonosti liuenneet näytteet suodatettiin pumpulin avulla Pasteur-pipetin läpi. Näytteet siirrettiin mitattavaksi halkaisijoiltaan 5 mm NMR -putkiin.

4 Tulokset

Alla läpikäydään spektrien tulkintaa mitattujen ^1H ja ^{13}C NMR -spektrien perusteella ja katsotaan ovatko ne yhteensopivia tutkittavien lääkeainelaboratorion synteesituotteiden rakenteiden kanssa.

4.1 5-sulfosalisyylialdoksiimin NMR -spektrien tulkinta

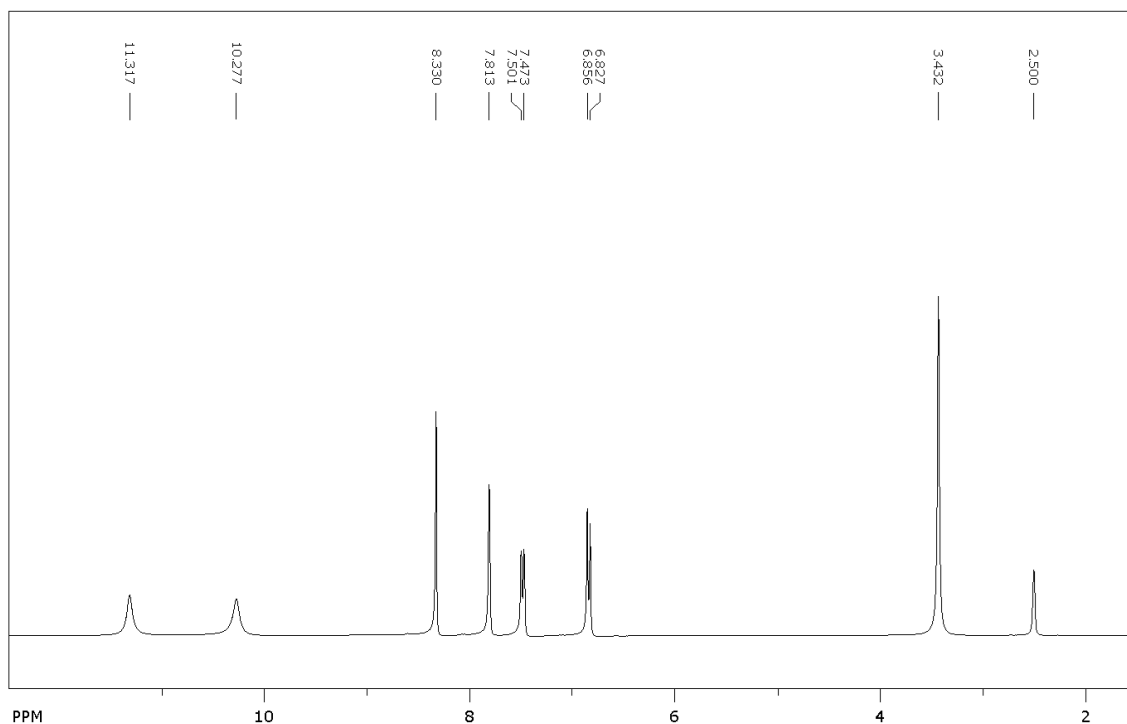
SUL-OX1 synteesistä saadun tuotteen 5-sulfosalisyylialdoksiimin kemiallinen rakenne on esitetty kuvassa 9. Kuvassa 10 on esitetty ^1H NMR -spektri ja kuvassa 11 ^{13}C NMR -spektri. Näytettä varten punnittu massa oli 61,44 mg ja liuottimena käytettiin 800 μl DMSO- d_6 .



Kuva 9. 5-sulfosalisyylialdoksiimin kemiallinen rakenne

^1H NMR -spektrin todetut kemiallisten siirtymien arvot ja signaalien multiplisiteetit sekä suhteelliset protonimäärät.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 11,32 (s, 2H, OH), 10,28 (s, 2H, OH), 8,33 (s, 2H, –HC=N–), 7,81 (d, $J=2,2$ Hz, 2H, ArH), 7,50–7,47 (dd, $J=8,4$, 2,2 Hz, 2H, ArH), 6,86–6,83 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, ArH) ppm.

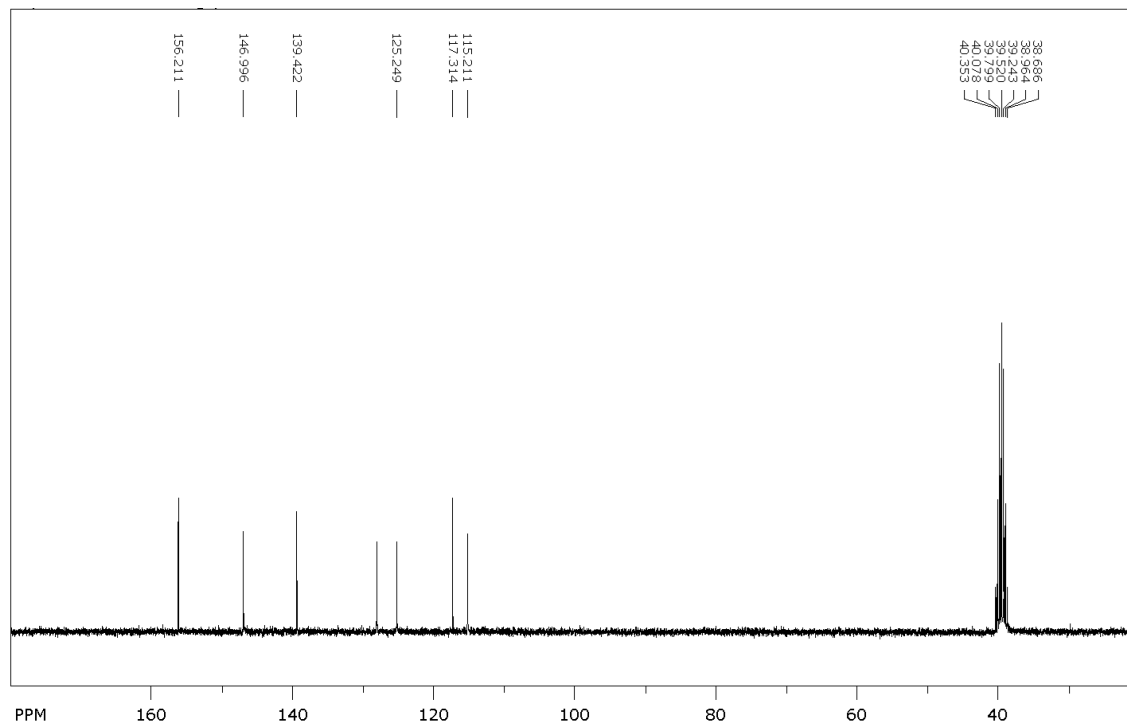


Kuva 10. 5-sulfosalisyylaldoksiimin ^1H NMR -spektri DMSO-d_6 liuotuksessa.

Kuvassa 10 on esitetty 5-sulfosalisyylaldoksiimin ^1H NMR -spektri. Siitä nähdään kolmen aromaattisen vedyn, kahden OH-ryhmän ja $-\text{HC}=\text{N}-$ ryhmän protonien signaalit. Protonien signaalit molemmissa OH-ryhmissä tulevat spektrissä 11,32 ja 10,30 ppm kemiallisten siirtymien arvoille. Molempien signaalien piikit näkyvät matalina ja leveinä, kuten niiden tulee näkyä. Aromaattiset protonit näkyvät 6,82 - 8,34 ppm:n kemialliselle siirtymäalueelle, mutta niistä on mahdotonta sanoa varmasti, mille siirtymäarvolle mikäkin protoni tulee. Ryhmän $-\text{HC}=\text{N}-$ protonin signaali tulee 8,33 ppm:n kohdalle. Liuotimesta aiheutuva signaali nähdään kemiallisella siirtymäarvolla 2,5 ppm ja siinä olevan veden piikki tulee sen tyypilliselle siirtymäarvolle 3,4 ppm. Näin ollen ^1H NMR -spektri sopii yhteen tutkittavan tuotteen oletetun rakenteen kanssa.

^{13}C NMR -spektrin todetut hiiliydinten kemialliset siirtymäarvot.

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 156,20, 147,00, 139,42, 125,25, 117,31, 115,21 ppm.

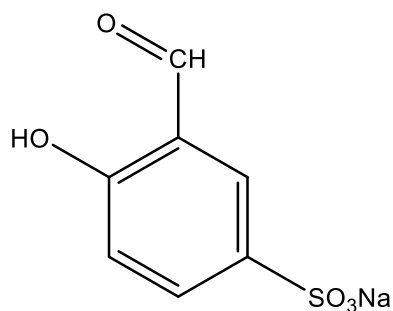


Kuva 11. 5-sulfosalisyylaldoksiimin ^{13}C NMR -spektri DMSO- d_6 liuotuksessa

5-sulfosalisyylaldoksiimin ^{13}C NMR -spektri nähdään kuvassa 11. ^{13}C NMR -spektrissä näkyy seitsemän piikkiä, jotka kaikki osuvat oikeille kemiallisille siirtymäarvoille. Tämä tarkoittaa, että kaikki seitsemän hiiltä ovat erilaisia. Niistä kuusi on aromaattista hiiltä ja yksi aldehydi-ryhmän hiili. Aldehydi-ryhmän hiilen tarkkaa paikkaa ei voida sanoa. Tiedetään kuitenkin, että se on joko 147,0 tai 156,2 ppm:n siirtymäarvolla. Tämä voitaisiin selvittää heteronukleaarisella 2D-NMR:llä, mutta sen selvittämiseen ei tehty lisätutkimusta. ^{13}C NMR -spektrissä DMSO- d_6 :n signaali nähdään kemiallisella siirtymäarvolla 39,5 ppm. Myös tämän spektrin tulokset sopivat yhteen tutkittavan synteesituotteen oletetun rakenteen kanssa.

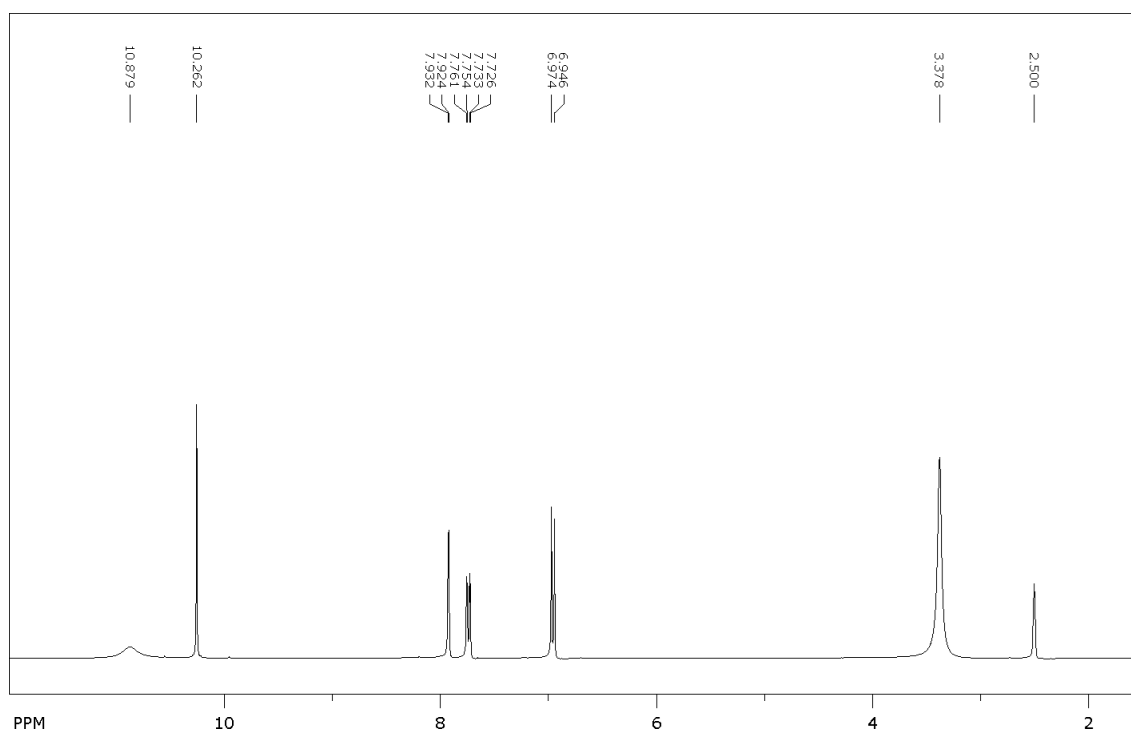
4.2 5-sulfosalisyylialdehydin NMR -spektrien tulkinta

5-sulfosalisyylialdehydin kemiallinen rakenne on esitetty kuvassa 12. Kuvassa 13 on esitetty sen ^1H NMR -spektri ja kuvassa 14 ^{13}C NMR -spektri. Näytettä varten punnittu massa oli 41,54 mg ja liuottimena käytettiin 800 μl DMSO- d_6



Kuva 12. 5-sulfosalisyylialdehydin kemiallinen rakenne

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,88 (s, 1H, OH) 10,26 (s, 1H, CHO), 7,93 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, ArH), 7,74 (dd, $J = 8,6, 2,3$ Hz, 1H, ArH), 6,96 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, ArH) ppm.

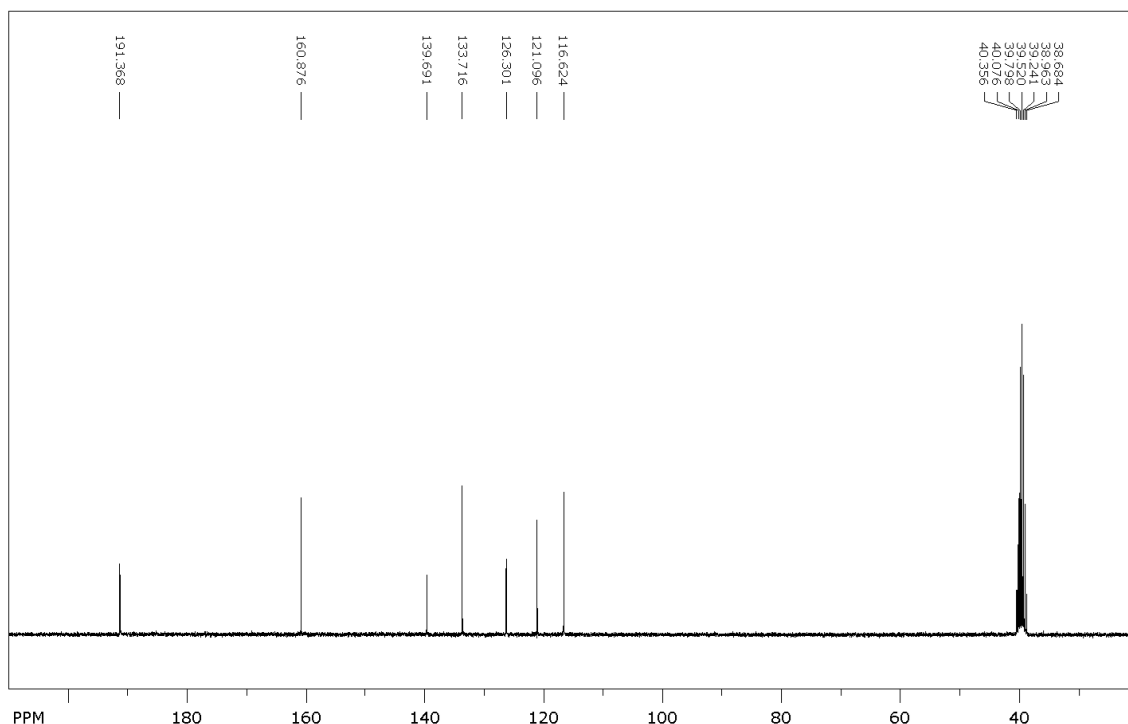


Kuva 13. 5-sulfosalisyylialdehydin ^1H NMR -spektri DMSO- d_6 liuottimessa

5-sulfosalisyylialdehydin ^1H NMR -spektri on esitetty kuvassa 13, josta nähdään kolme aromaattista protonia sekä yksi aldehydi-ryhmän ja yksi OH-ryhmän protoni. Aldehydin

protoni näkyy terävänä piikkinä, joka tulee kemialliselle siirtymäarvolle 10,3 ppm ja sen viereen siirtymäarvolle 10,9 ppm tulee leveämpi ja matalampi OH-ryhmän protonin signaali. Kolme aromaattista protonia tulevat kemialliselle siirtymäalueelle 6,94 - 7,94 ppm. Tämänkin näytteen liuottimena käytettiin deutoitua dimetyylisulfoksidia (DMSO-d₆) ja siitä aiheutuva signaali nähdään siirtymäarvolla 2,5 ppm sekä siirtymäarvolla 3,4 ppm havaitaan siinä olevan veden signaali. ¹H NMR -spektri sopii yhteen oletetun rakenteen kanssa.

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 191,37, 160,88, 139,69, 133,72, 126,30, 121,10, 116,62.

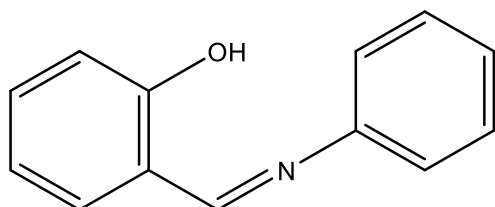


Kuva 14. 5-sulfosalisyylialdehydin ¹³C NMR -spektri DMSO-d₆ liuottimessa

5-sulfosalisyylialdehydin ¹³C NMR -spektrissä, joka on esitetty kuvassa 14, esiintyy seitsemän erilaista hiiltä. Aromaattisten hiilten signaalit tulevat 116 - 161 ppm:n kemialliselle siirtymäalueelle. Aldehydi-ryhmän paikkaa vertaamalla taulukkoarvoihin kemiallisen siirtymän perusteella voidaan päätellä olevan siirtymäarvolla 191,4 ppm. Ja hiiliatomi johon on liittynyt OH-ryhmä, tulee siirtymäarvolle 160,9 ppm. Liuottimen signaali nähdään siirtymäarvolla 39,5 ppm. Tämän näytteen ¹³C NMR -spektri on myöskin yhteensopiva tuotteen oletetun rakenteen kanssa.

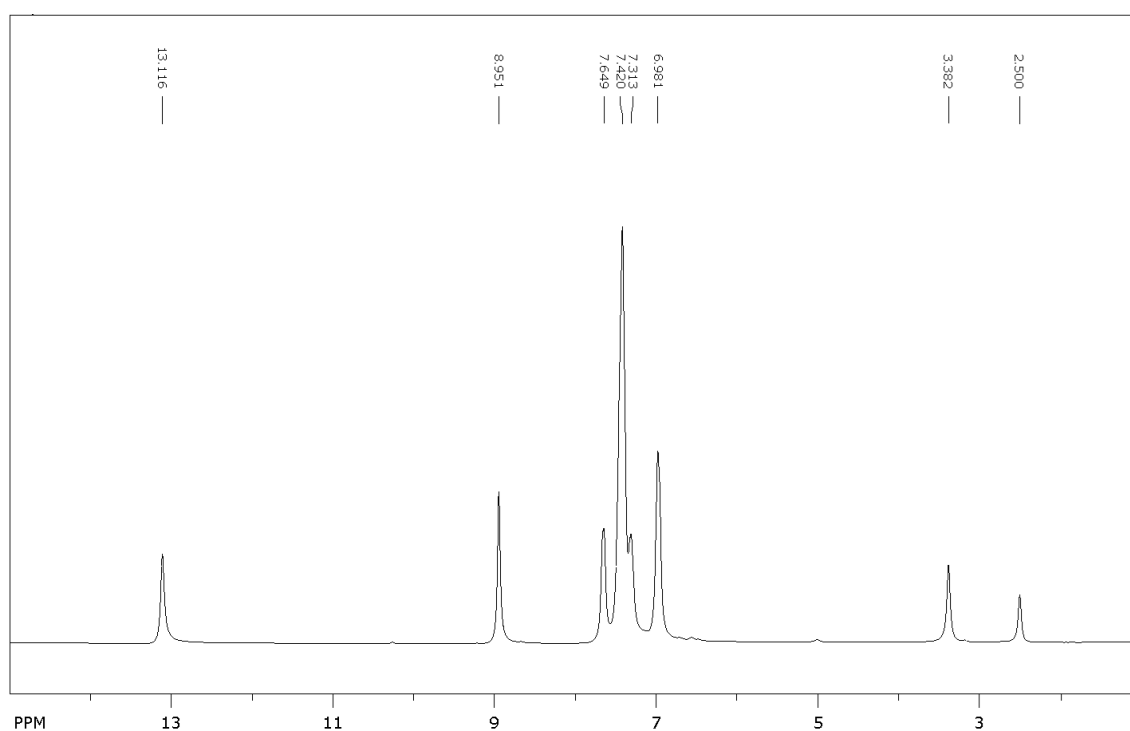
4.3 Salisyylideenianilidin NMR -spektrien tulkinta

Salisyylideenianilidi kemiallinen rakenne nähdään kuvassa 15. Kuvassa 16 on esitetty sen ^1H NMR -spektri ja kuvassa 17 ^{13}C NMR -spektri. Näytettä varten punnittu massa oli 40,29 mg ja liuottimena käytettiin 800 μl DMSO- d_6 .



Kuva 15. Salisyylideenianilidi kemiallinen rakenne

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,12 (s, 1H, OH), 8,95 (s, 1H, $-\text{HC}=\text{N}-$), 7,65 (dd, $J = 8,0, 1.8$ Hz, 1H, ArH), 7,52 – 7,36 (m, 5H, ArH), 7,39 – 7,25 (m, 1H, ArH), 7,04 – 6,92 (m, 2H, ArH) ppm.

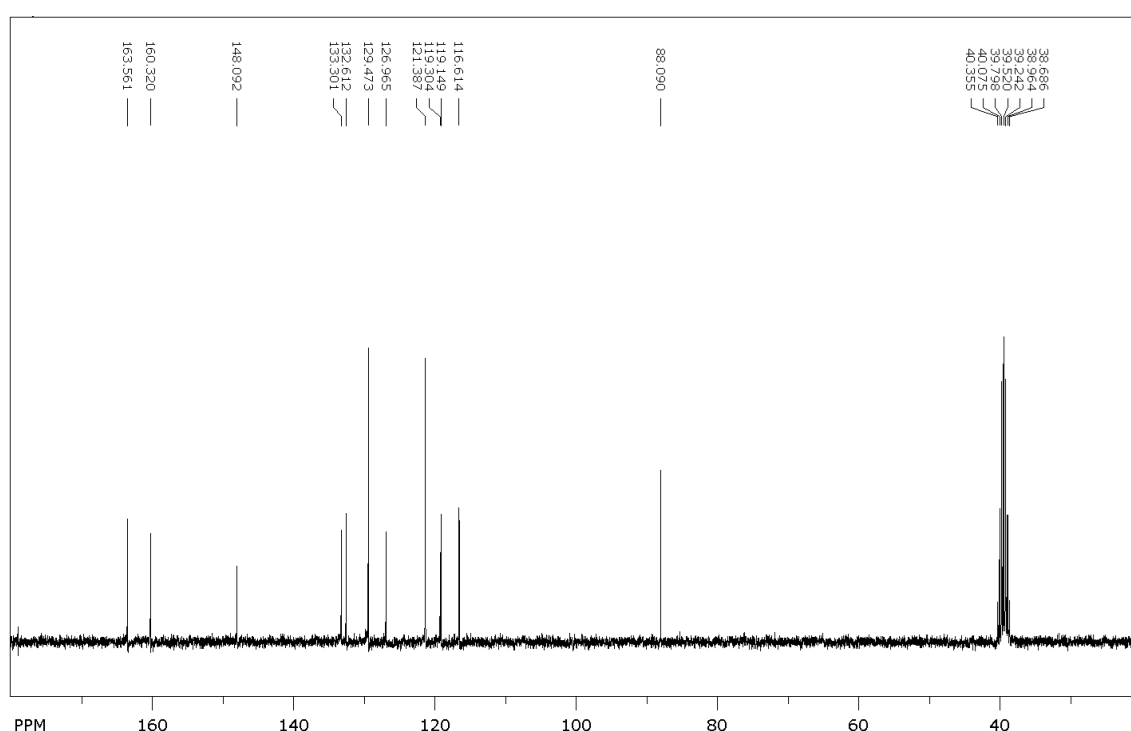


Kuva 16. Salisyylideenianilidin ^1H NMR -spektri DMSO- d_6 liuotuksessa

Kuvassa 16 on esitetty salisyylideenianilidin ^1H NMR -spektri. Tuotteen oletetun molekyylin rakenteen mukaan ^1H NMR -spektrissä pitäisi esiintyä 11:n vetyatomin signaalit.

OH-ryhmän protonin signaali nähdään 13,1 ppm kemiallisen siirtymäarvolla piikin paikan ja leveyden perusteella. Aldimiiniprotonin signaali näkyy 8,95 ppm:n siirtymäarvolla. Yhdeksän aromaattisten protonien signaalit tulevat 6,98 - 7,65 ppm:n kemialliselle siirtymäalueelle. Liuottimesta aiheutuva signaali nähdään kemiallisella siirtymäarvolla 2,5 ppm ja sitä sisältävän veden piikki tulee sen tyypilliselle siirtymäarvolle 3,4 ppm. Tästä voidaan sanoa, että ^1H NMR -spektri täsmää yhteen tutkittavan tuotteen oletetun rakenteen kanssa.

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163.57, 160.32, 148.10, 133.30, 132.61, 129.48, 126.97, 121.39, 119.14, 116.61, 88,10 ppm.



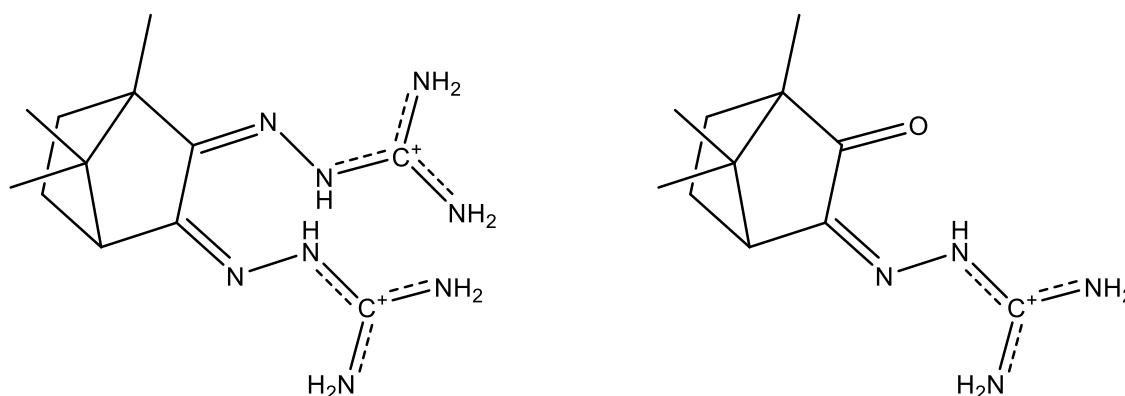
Kuva 17. Salisylylidenanilidin ^{13}C NMR -spektri DMSO- d_6 liuottimessa

Oletetun rakenteen mukaan ^{13}C NMR -spektrissä, joka on esitetty kuvassa 17, pitäisi näkyä 11 ^{13}C -ydinten piikkiä, mutta mitatussa spektrissä näkyy 12 piikkiä. Tämä voi johtua epäpuhtaudesta tai syn-anti -isomeriasta, joka on nimitys cis-trans -isomerialelle, siinä tapauksessa, kun kaksoissidos on hiili- ja typpiatomien välissä hiili-hiili kaksoissidoksen sijaan, kuten cis-trans -isomeriassa. Sen selvittäminen vaatii kuitenkin laajoja jatkotutkimuksia, joita tässä työssä ei tehty. Epäpuhtauden osuus voitaisiin selvittää synteesin uudelleenkitetyksellä moneen kertaan, mutta se voitaisiin tutkia myös monimutkaisilla

NMR -menetelmillä. Tyypeen liittyneessä bentseenissä on neljä ei-ekvivalenttia aromaattista hiiltä ja hiileen liittyneessä bentseenissä on kuusi ei-ekvivalenttia aromaattista hiiltä sekä yksi aldimiini hiili. Deuteroitun dimetyylisulfoksidin (DMSO- d_6) signaali näkyy 39,5 ppm kemiallisella siirtymäarvolla. Tästä ^{13}C NMR -spektristä voidaan sanoa, että se sopii yhteen tuotteen oletetun rakenteen kanssa, mutta yhden ”ylimääräisen” signaalin alkuperä jää avoimeksi.

4.4 Kamferikinoni-(guanyylihydratsonin) NMR -spektrien tulkinta

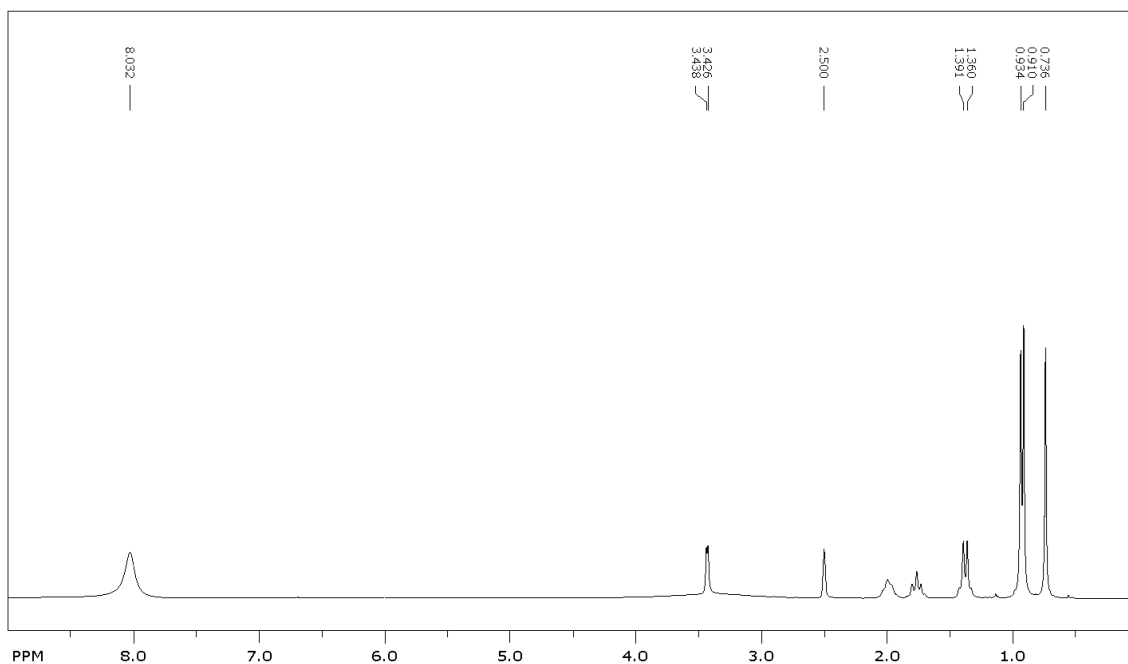
Synteesillä oli tarkoitus valmistaa kamferikinoni-bis(guanylihydratsonia), mutta valmistettu tuote osoittautui kamferikinoni-(guanylihydratsoniksi). Valmistetun tuotteen rakennetta oli selvitetty röntgendiffraktiometrialla (liite 1). Kuvan 18 vasemmalla nähdään synteesillä yritetty rakenne ja oikealla valmistetun tuotteen rakennetta, jossa toinen karbonyyliryhmä on reagoimatta.



Kuva 18. Vasemmalla on synteesin yritetty rakenne kamferikinoni-bis(guanylihydratsoni) ja oikealla on saadun tuotteen kamferikinoni-(guanylihydratsonin) kemiallinen rakenne.

Kamferikinoni-(guanylihydratsoni) ^1H NMR -spektri nähdään kuvassa 19 ja ^{13}C -NMR -spektri kuvassa 20. Näytettä varten punnittu massa oli 42,05 mg ja liuottimena käytettiin 800 μl DMSO- d_6

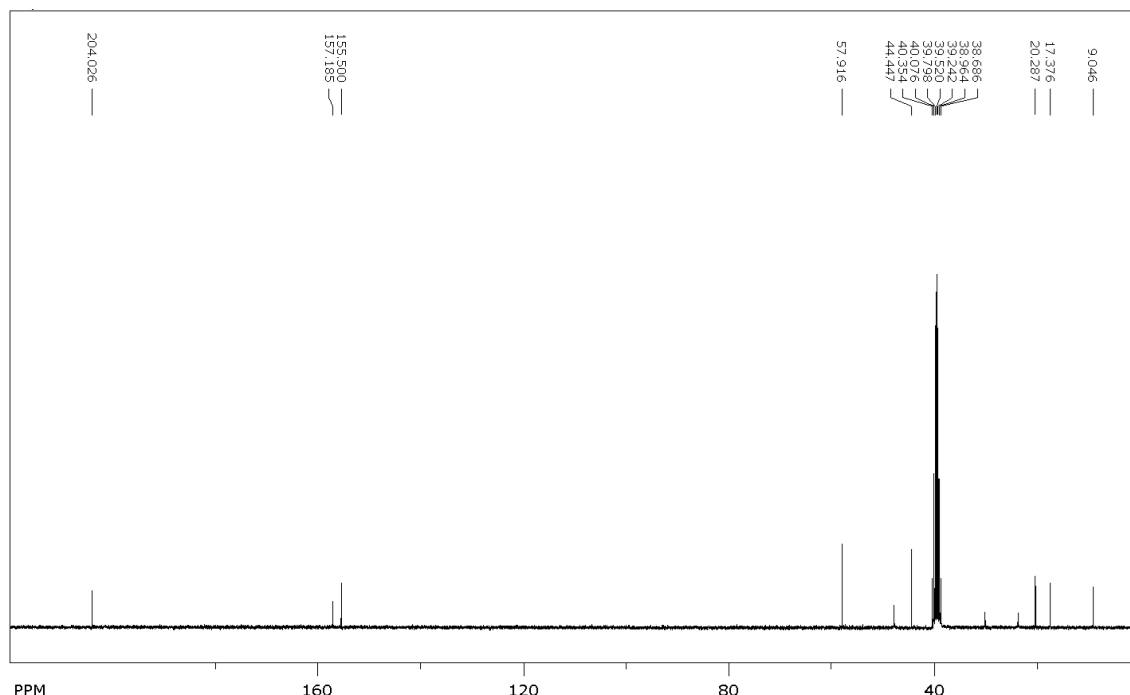
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,03 (s, 2H, Guanidiini), 2,00 (td, J = 8,8, 4,7 Hz, 1H), 1,76 (p, J = 10,1 Hz, 1H), 1,38 (d, J = 9,1 Hz, 2H, SykloH), 0,92 (d, J = 7,2 Hz, 5H, CH_3), 0,74 (s, 3H, CH_3) ppm.



Kuva 19. Kamferikiloni-(guanyylihydratsonin) ^1H NMR -spektri DMSO-d_6 liuotuksessa

Kuvassa 19 esitetyssä kamferikiloni-(guanyylihydratsonin) ^1H NMR -spektrissä kolme metyyliryhmää näkyy singleteinä siirtymäalueella 0,73 - 0,94 ppm. Se voidaan päätellä siitä, että niissä ei ole kytkentää sekä niiden intensiteetistä ja paikasta spektrissä. Sykloheksaaniin liittyneen molekyylioson (guanyyliryhmän) vaikutus on vähäinen ^1H NMR -spektriin, koska siitä ei tule mitään kytkentää. Rengasrakenteen protonien signaalit tulevat kemialliselle siirtymäalueelle 1,3 - 1,4 ppm. Guanidiinin protonien leveä signaali näkyy siirtymäarvolla 8,0 ppm. Liuotimesta aiheutuva signaali nähdään kemiallisella siirtymäarvolla 2,5 ppm ja siinä olevan veden signaali näkyy kemiallisella siirtymäarvolla 3,4 ppm. Tuotteen ^1H NMR -spektri on guanyyliryhmän signaalia lukuun ottamatta vastaava kuin liitteenä 2 [15] olevan kamferikilonin ^1H NMR -spektri. Eli tästä voidaan sanoa, että tuotteen mitattu ^1H NMR -spektri on yhteensopiva sen oletetun rakenteen kanssa.

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 204,01, 157,17, 155,49, 57,91, 47,80, 44,45, 30,09, 23,65, 20,29, 17,38, 9,05 ppm.

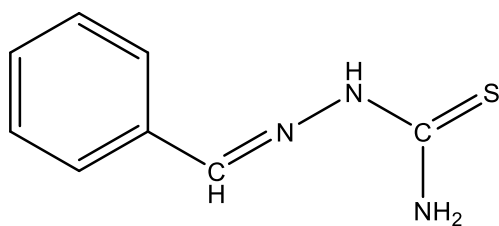


Kuva 20. Kamferikinoni-(guanyylihydratsonin) ^{13}C NMR -spektri DMSO- d_6 liuotuksessa

^{13}C NMR -spektri nähdään kuvassa 20. Synteesin molekyylin rakenne oli selvitetty röntgendiffraktiometrillä ja nyt oli tarkoitus varmistaa sen rakennetta NMR -spektrometrillä. ^{13}C NMR -spektrissä pitäisi näkyä kymmenen hiilen piikkiä. Hiilen kemiallisen siirtymän taulukkoarvoihin perusteella ketoni-ryhmän hiilen paikka tulee siirtymäarvolle 204,0 ppm. Ja imiini-ryhmän hiili tulee kemialliselle siirtymäarvolle 157,2 ppm. Liuotin näkyy kemiallisella siirtymäarvolla 39,5 ppm. Mitattu ^{13}H NMR -spektri sopii yhteen oletetun rakenteen kanssa.

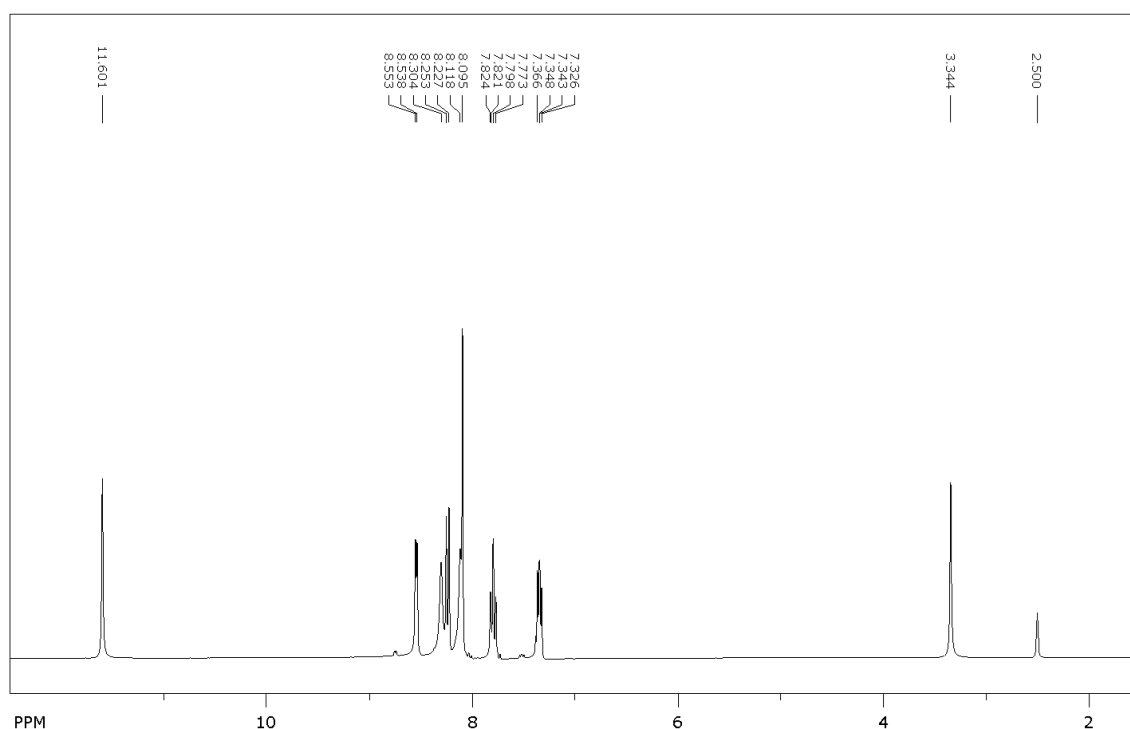
4.5 Pyridiini-2-karboksaldehydin tiosemikarbatsonin NMR -spektrien tulkinta

Pyridiini-2-karboksaldehydin tiosemikarbatsoni synteesin rakenne kuvassa 21. Ja kuvassa 22 on esitetty ^1H NMR -spektri sekä kuvassa 23 ^{13}C NMR -spektri. Näytettä varten punnittu massa oli 61,08 mg ja liuottimena käytettiin 800 μl DMSO- d_6 .



Kuva 21. Pyridiini-2-karboksaldehydin tiosemikarbatsonin kemiallinen rakenne

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,65 (s, 2H, CH=N), 8,55 (d, J = 3,9 Hz, 0H, ArH), 8,37 (s, 2H, ArH), 8,26 (d, J = 8,0 Hz, 1H, ArH), 8,18 (s, 2H, ArH), 8,09 (s, 1H), 7,80 (t, J = 7,8 Hz, 1H, ArH), 7,43 – 7,29 (m, 1H, ArH) ppm.

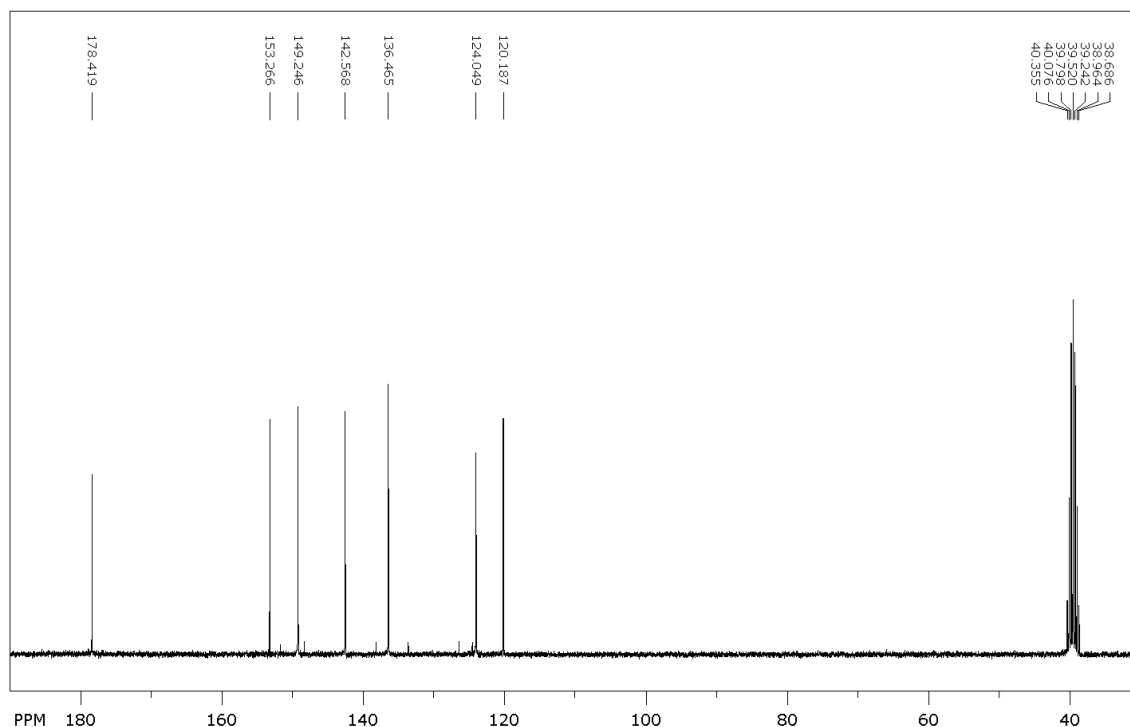


Kuva 22. Pyridiini-2-karboksaldehydin tiosemikarbatsonin ^1H NMR -spektri DMSO- d_6 liuottimessa

Kuvassa 22 on esitetty pyridiini-2-karboksaldehydin tiosemikarbatsonin ^1H NMR -spektri. Oletetun rakenteen mukaan ^1H NMR -spektrissä protonien signaaleja pitäisi olla kahdeksan. CH=N protoni tulee oudon isolle kemialliselle siirtymäalueelle terävänä piikkinä. Aromattiset ja ehkä tyypen liittyneet protonit tulevat kemialliselle siirtymäalueelle 7,3 - 8,6 ppm. Koska piikit ovat huonosti resoluoituneet, ei voida tarkasti kertoa mikä protoni tulee millekin siirtymäarvolle. 2D NMR -spektrin mittaaminen ei ollut mahdollista, mutta

sillä voitaisiin tutkia lisää protonien signaalien alkuperää. Liuottimen ja veden piikit tulevat kemiallisille siirtymäarvoille 2,5 ppm ja 3,4 ppm. ^1H NMR -spektri sopii yhteen tuotteen oletetun rakenteen kanssa.

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 178,42, 153,27, 149,25, 142,57, 136,47, 124,05, 120,19 ppm.

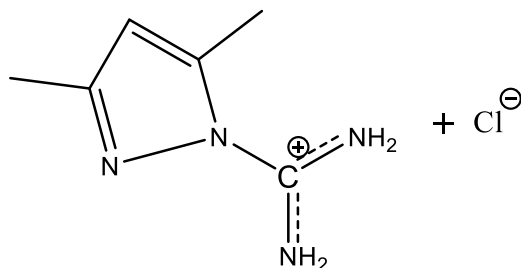


Kuva 23. Pyridiini-2-karboksaldehydin tiosemikarbatsonin ^{13}C NMR -spektri DMSO- d_6 liuottimessa

Kuvassa 23 nähdään pyridiini-2-karboksaldehydin tiosemikarbatsonin ^{13}C NMR -spektri. ^{13}C NMR -spektrissä oletetun rakenteen mukaan pitäisi näkyä seitsemän hiilipiikkiä. Niin kuin mitatussa spektrissä näkyykin. Tioni-hiili näkyy kemiallisella siirtymäarvolla 178,4 ppm ja aromaattiset hiilet tulevat siirtymäalueelle 120,1 - 153,3 ppm. Liuottimen signaali näkyy kemiallisella siirtymäarvolla 39,5 ppm. Myös ^{13}C NMR -spektri sopii yhteen tuotteen oletetun rakenteen kanssa.

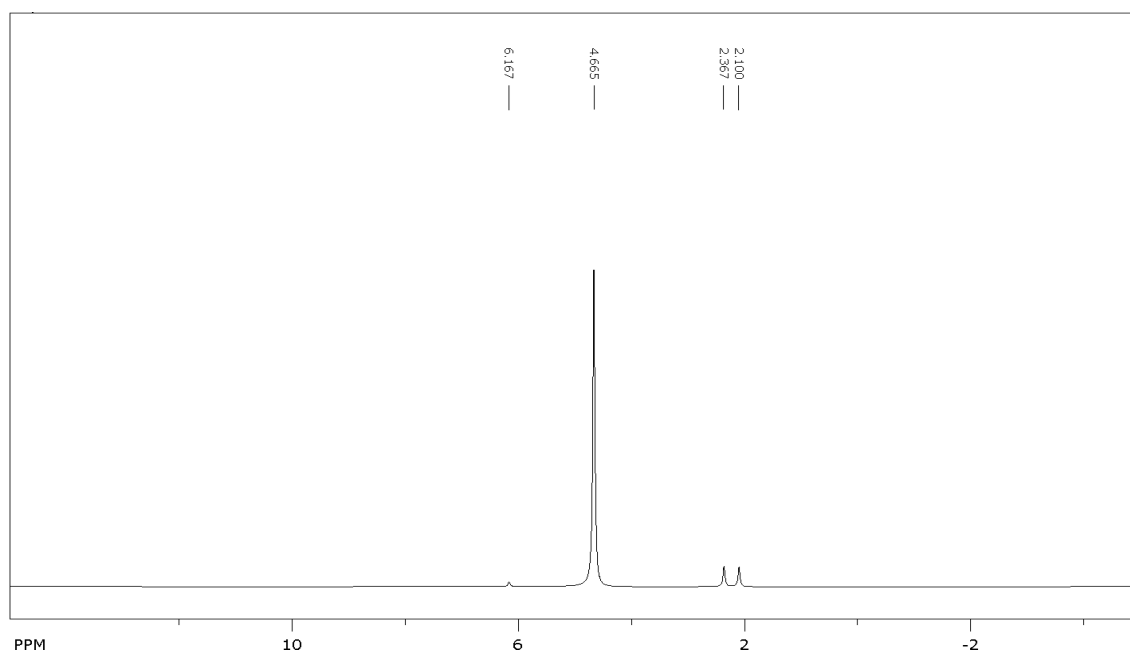
4.6 Dimetyylipyraatsiinijohdoksen NMR -spektrien tulkinta

Tutkittavana oli synteesituote, jolla oletettiin olevan kuvan 24 mukainen rakenne. Kuvassa 25 on esitetty ^1H NMR -spektri ja kuvassa 26 ^{13}C NMR -spektri. Näytettä varten punnittu massa oli 39,11 mg ja liuottimena käytettiin 800 μl D_2O .



Kuva 24. Dimetyylipyraatsiinijohdoksen oletettu kemiallinen rakenne

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 6,25 (s, 1H, CH_2), 2,45 (d, $J = 79,5$ Hz, 7H, CH_3) ppm.

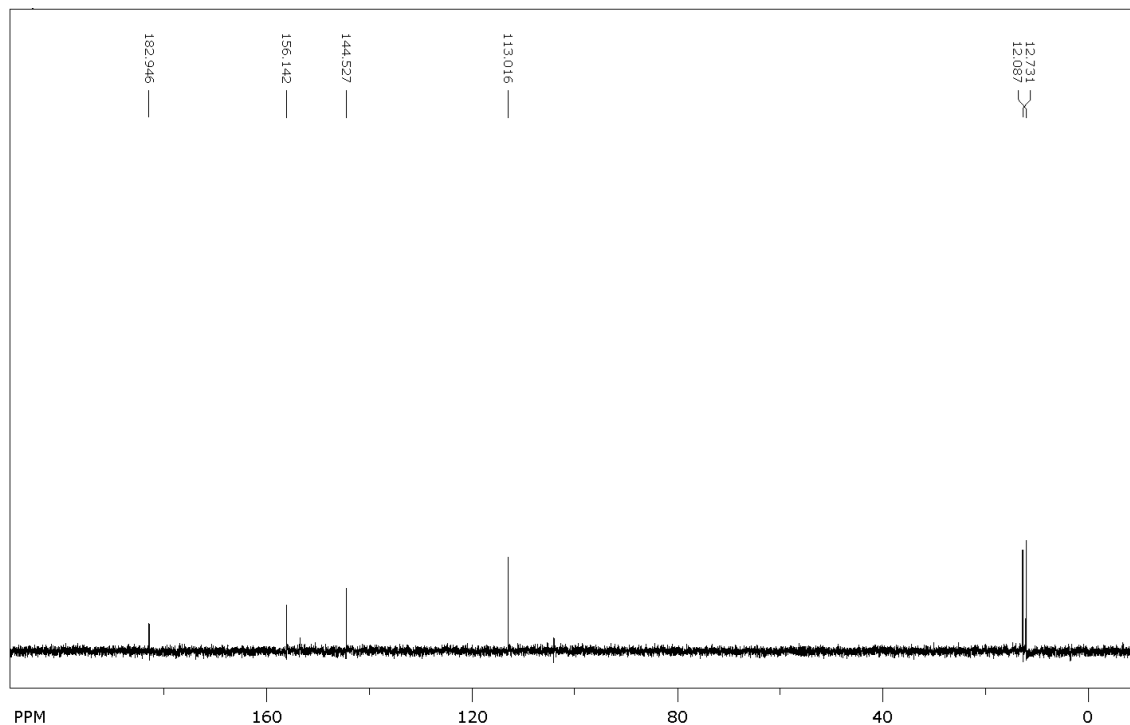


Kuva 25. Dimetyylipyraatsiinijohdoksen ^1H NMR -spektri D_2O liuottimessa

Kuvassa 25 nähdään tuotteen ^1H NMR -spektri. Siinä kaksi signaalia tulee 2,1 ja 2,4 ppm kemialliselle siirtymäarvolle, jotka viittaavat kahden metyyliryhmän protoneihin. Alkeenin protonin signaali nähdään kemiallisella siirtymäarvolla 6,2 ppm. Tämän näytteen liuottimena käytettiin deuteroitua raskasta vettä D_2O :ta, mistä johtuen typhen protonit vaihtuvat deuteriumeiksi D_2O :ssa. Tästä syystä typhen protonit leviävät laajalle eivätkä näy spektrissä. Näytteen sisältämän runsaan kosteuden ja happamuuden takia veden piikillä

on iso intensiteetti ja sen paikka on siirtynyt tavallista korkeammalle kemialliselle siirtymääräarvolle spektrissä. ^1H NMR -spektri sopii yhteen oletetun rakenteen kanssa.

^{13}C NMR (D_2O) δ 182,95, 156,14, 144,53, 113,02, 12,73, 12,09 ppm



Kuva 26. Dimetyylipyratsiinijohdoksen ^{13}C NMR -spektri D_2O liuotuksessa

Kuvassa 26 olevassa ^{13}C NMR -spektrissä näkyy kuusi signaalia ^{13}C -ytimille, joista kaksi metyyliryhmän hiiltä näkyvät kemiallisilla siirtymääräarvoilla 12,7 ja 12,1 ppm. Alkeeni-ryhmän hiilen signaali nähdään siirtymäärävolla 113,0 ppm ja typpiin liittyneet renkaanhiilet tulevat siirtymääräarvoille 144,5 ppm ja 156,1 ppm. Amidinoryhmän hiili, johon on liittynyt kolme tyyppiä, näkyy kemiallisella siirtymäärävolla 182,9 ppm. Liuotimesta aiheutuvaa signaalia ei nähdä spektrissä, koska liuottimena on D_2O . Myös ^{13}C NMR -spektri on yhteensopiva oletetun rakenteen kanssa.

5 Yhteenveto ja johtopäätökset

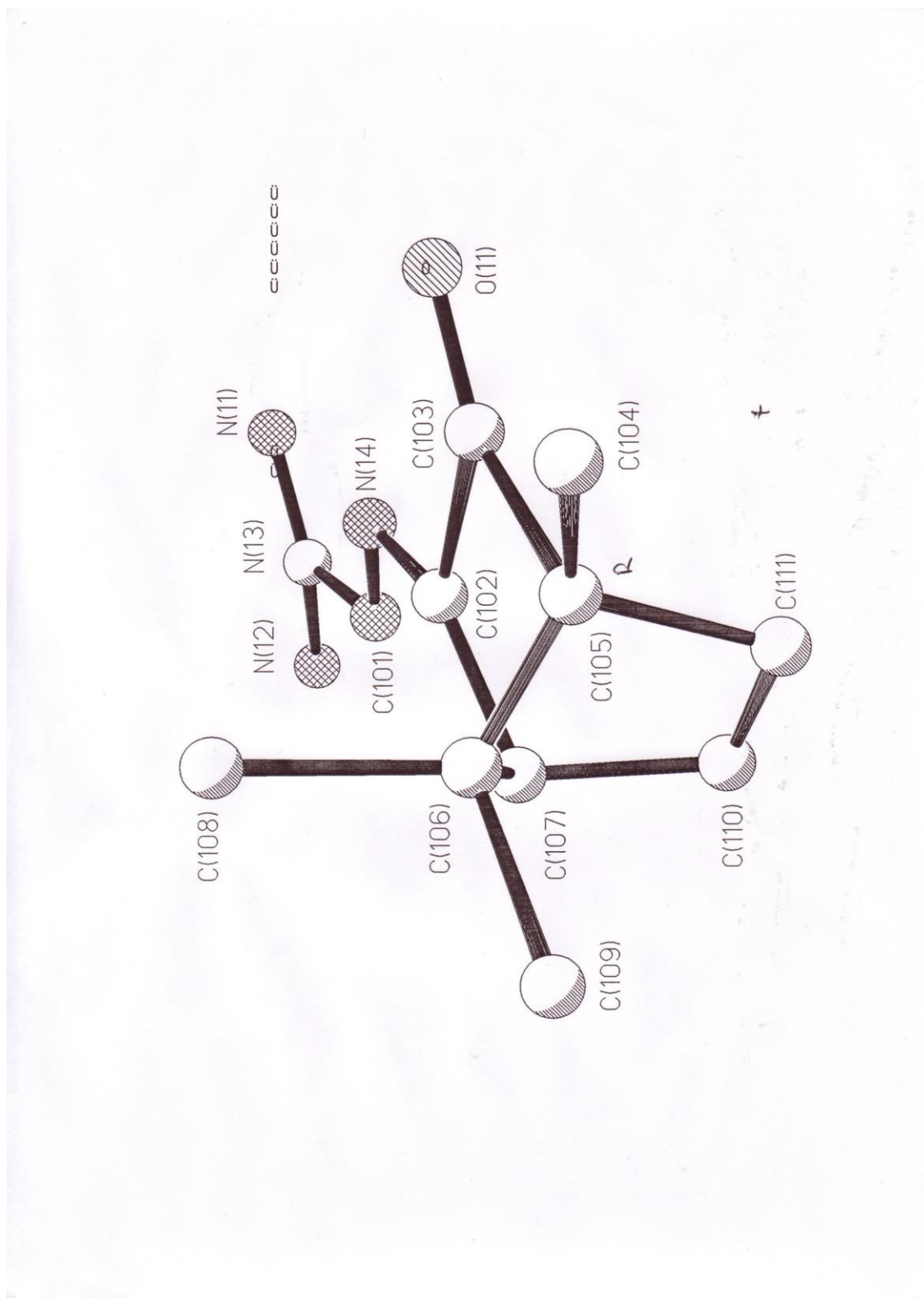
Mitatuista synteesituotteista saatiin useimmissa tapauksissa hyvät ja selvät spektrit. Ja monessa tapauksessa niiden avulla pystyttiin varmistamaan niiden rakenteet. Joidenkin tuotteiden liukoisuus oli niin huono, että niistä ei voitu tehdä NMR -mittauksia tai ei saatu kunnon spektrejä kohtuullisilla mittausajoilla. Tehtiin myös muita mittauksia, mutta laitteisto-ongelmat vaikeuttivat monissa tapauksissa kelvollisten tulosten saantia. Yhden tutkittavan näytteen synteesiselostus oli kadonnut muuttojen yhteydessä. Tämän takia kyseisen näytteen spektrit eivät ole esitetty tässä opinnäytetyössä. Vaikka siitä saatiin selkeät ja yksikäsitteiset spektrit, niiden perusteella ei yksistään voitu selvittää synteesin rakenneta.

Synteesin suoritus onnistui hyvin ja lopputuloksena saatiin puhdas tuote hyvällä saannolla. Saatiin aikaan myös toimiva synteesiohje, mutta koska saalis ei ollut täysin optimaalinen, tutkimuksia vielä jatketaan paremman saalisprosentin saavuttamiseksi. Lisäksi aineen lisäpuhdistus menetelmien kehittämiseksi on tarvetta, koska ainetta saatetaan tarvita biologisiin tutkimuksiin.

Lähteet

- 1 NMR Applications. Verkkodokumentti. Michigan State University 900 MHz NMR Facility. <https://www2.chemistry.msu.edu/facilities/nmr/900Mhz/MCSB_NMR_applications.html> Luettu 13.09.2015
- 2 Derrick Kaseman and Revathi Srinivasan Ganesh Iyer. NMR: Introduction. Verkkodokumentti. <<http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/pages/1834/pdf/NMR%253A%2bIntroduction.pdf>> Luettu 13.09.2015
- 3 Prof. Hannu Elon Orgaanisten yhdisteiden rakennetutkimus –luennot, Helsingin yliopisto, Farmaseuttisen biologian osasto, 04/2014
- 4 Andrew Streitwieser, Clayton H. Heathcock, Edward M. Kosower. 1992. Introduction to Organic Chemistry. 4. painos. Prentice-Hall, Inc.
- 5 P.J. Hore. 1994. Nuclear Magnetic Resonance. Oxford University Press Inc. New York.
- 6 Henrik Konschin, Jaakko Paasivirta, Folke Stenman, Franciska Sundholm. 1984. Instrumenttianalytiikka 7: Optinen ja magneettinen spektroskopia. Teknillisten tieteiden akatemia. Gummerus Oy. Jyväskylä.
- 7 Peter Atkins, Julio de Paula. 1998. Atkins' Physical Chemistry, 6. painos. Oxford University Press Inc.
- 8 Quincy Teng. 2013. Structural Biology Practical NMR Applications. 2. painos. Springer Science+Business Media. New York
- 9 Varian, Inc. 1999. System Overview. Verkkodokumentti. Varian ^{UNITY}INOVA NMR spectrometer systems. <http://www.chem.uit.no/ok/nmr/VNMR_online/inova/0199903700b.pdf> Luettu 30.09.2015
- 10 J.W. Akitt, B.E. Mann. 2000. NMR and chemistry: an introduction to modern NMR spectroscopy. 4. painos. Stanley Thornes (Publishers) Ltd.
- 11 Volovenko Yu.M., Karcev V.G., Komarov I.V., Turov A.V., Hilya V.P. 2011. Spektroskopiya yadernogo magnitnogo rezonansa dlya himikov. International Charitable foundation "Scientific Partnership Foundation".
- 12 NMR Sample Preparation. Verkkodokumentti. <http://academic.sun.ac.za/saf/services/downloads/services5/NMR_Sample_Preparation.pdf> Luettu 23.09.2015
- 13 Things to know before you begin operating an NMR. Verkkodokumentti. <<http://web.mit.edu/speciab/www/PDF/DCIF-Things-2-know-NMR-m08.pdf>> Luettu 25.09.2015
- 14 Dennis F. Evans and Paul H. Missen. 1985. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions. 7. julkaisu. Some water-soluble Schiff-base complexes of nickel(II): the role of water –artikkeli. s. 1451–1454.
- 15 Sigma-Aldrich. Camphorquinone. NMR -spektri. Verkkodokumentti. <<http://www.sigmaaldrich.com/spectra/fnmr/FNMR000640.PDF>> Liite 2, Luettu 20.08.2015

Liite 1: Kamferikinoni-(guanyylihydratsonin) röntgendiffraktiometrisesti mitattu avaruusrakenne



Liite 2: Kamferikininin ^1H NMR -spektri

